

Université de Montréal

**Les récepteurs 5-HT_{4b} adoptent différentes
conformations ligand-spécifique ayant des
propriétés de signalisation et de régulation distinctes**

par

Stéphane Younes

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie

Avril, 2012

© Stéphane Younes, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Les récepteurs 5-HT_{4b} adoptent différentes conformations ligand-spécifique
ayant des propriétés de signalisation et de régulation distinctes**

Présenté par :
Stéphane Younes

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. René Cardinal, président-rapporteur

Dre. Graciela Pineyro, directrice de recherche

Dre. Sandra Boye, co-directrice

Dre. Audrey Claing, membre du jury

Résumé

Les antidépresseurs actuels sont très similaires au niveau de leur mécanisme d'action et sont plus ou moins efficaces. Un des problèmes majeurs est leur long temps de latence à fournir une action thérapeutique dû aux adaptations des sites pré et post synaptiques. Dans un modèle animal, nous avons récemment découvert que l'agoniste RS67333 des récepteurs 5-HT₄ était en mesure de produire en trois jours les mêmes effets antidépresseurs qui normalement prennent de deux à trois semaines à apparaître avec les antidépresseurs actuellement disponibles. De plus, nous avons constaté que les effets antidépresseurs de cet agoniste possédaient une résistance à la tolérance. Il y a d'autres agonistes du même récepteur, tel que le prucalopride qui ne produit pas d'effets antidépresseurs comme RS67333. Étant donné que l'efficacité du Prucalopride à stimuler les 5-HT₄Rs est similaire sinon plus grande que celle de RS67333, nous avons énoncé l'hypothèse que le récepteur 5-HT₄ pourrait adopter différentes conformations actives suite à son activation par différents agonistes. Nous avons ainsi décidé d'explorer les principales réponses fonctionnelles des récepteurs 5-HT_{4B} en observant leurs propriétés de régulation et de signalisation.

Nous avons montré que l'isoforme B du récepteur 5-HT₄, étant hautement exprimé dans le système limbique, détient une signalisation et une régulation différentes dépendant du ligand activateur. Nos résultats indiquent que chacun des agonistes testés (5-HT, RS67333, ML10302, Zacopride, Prucalopride) modulent distinctivement la production d'AMPC et l'internalisation du récepteur. Les résultats nous ont clairement permis de déterminer que les agonistes possèdent une efficacité et ou puissance différentes les uns par rapport aux autres. De plus, l'ordre d'efficacité des agonistes à moduler la voie de l'AMPC était (Prucalopride > Zacopride = ML10302 = 5-HT > RS67333) et est différente de leur ordre d'efficacité à induire la régulation du récepteur par internalisation (5-HT > Zacopride > Prucalopride > ML10302 = RS67333). Ainsi, nous avons montré que les 5-HT₄Rs adoptent des conformations qui sont ligand-spécifiques.

Cela implique que la sélectivité fonctionnelle serait un facteur important à considérer dans les mécanismes d'action antidépresseur des agonistes de ce récepteur.

Mots-clés : récepteurs 5-HT₄, dépression, antidépresseurs, tolérance, AMPc, EPAC, désensibilisation, internalisation, 5-HT, RS67333, ML10302, Zaccopride, Prucalopride

Abstract

Antidepressants currently available are very similar toward their mechanism of action and are more or less effective. One major problem is their long latency to provide a therapeutic effect due to adaptations of pre and post synaptic locations. In an animal model, we recently discovered that the agonist RS67333 of the 5-HT₄ receptors was able to produce in three days the same antidepressant effects that normally take two to three weeks to appear with the currently available antidepressants. In addition, we found that the antidepressant effects of this agonist had a resistance to tolerance. There are others agonists of the same receptor such as prucalopride, which does not produce antidepressant effects as RS67333. Since the effectiveness of prucalopride to stimulate 5-HT₄Rs is similar if not greater than RS67333, we stated the hypothesis that the 5-HT₄ receptor could adopt different active conformations following its activation by various agonists. We decided to explore the major functional responses of 5-HT_{4B} by observing their regulatory and signaling properties.

We showed that the B isoform of the 5-HT₄, being highly expressed in the limbic system, has a different signaling and regulation depending on the ligand. Our results indicate that each of the agonists tested (5-HT, RS67333, ML10302, Zacopride, Prucalopride) distinctively modulate cAMP production and receptor internalization. The results have clearly identified that agonists differed in potency and efficacy. Moreover, the order of effectiveness of agonists to modulate the cAMP pathway was (prucalopride > zacopride = 5-HT = ML10302 > RS67333) different from their order of effectiveness in inducing receptor regulation by internalization (5-HT > Zacopride > Prucalopride > RS67333 = ML10302). Thus, we have shown that 5-HT₄Rs adopt conformations that are ligand-specific. This implies that functional selectivity is an important factor in the mechanisms of antidepressant action of this receptor agonists.

Keywords: 5-HT₄ receptors, depression, antidepressants, tolerance, cAMP, EPAC, desensitization, internalization, 5-HT, RS67333, ML10302, Zacopride, Prucalopride

Table des matières

Introduction	2
I. Neurones monoaminergique	3
1. Transmission sérotoninergique	3
II. Les antidépresseurs	5
1. Historique	5
2. Types d'antidépresseurs	6
a) Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO)	6
b) Les antidépresseurs tricycliques (ATC)	7
c) Les inhibiteurs sélectifs de la Recapture de la Sérotonine (ISRS)	8
d) Les antidépresseurs atypiques (Nouvelle génération)	8
3. Mécanisme d'action des antidépresseurs	9
III. Les récepteurs couplés aux protéines G	10
1. Historique	10
2. La protéine G	11
3. Récepteurs sérotoninergiques et effets	13
4. Modalités de liaison des récepteurs 5-HT à la protéine G	14
IV. Les récepteur 5-HT₄	15
1. Isoformes et distribution du récepteur 5-HT ₄	17
2. Signalisation	18
3. Régulation des récepteurs couplés aux protéines G	20
4. Théorie pharmacologique et sélectivité fonctionnelle	22

V. Méthodes expérimentales utilisées pour étudier l'activation et la fonction des RCPGs	244
1. Biosenseur EPAC	25
Hypothèse et objectifs	28
Matériel et méthodes	29
1. Réactifs	29
2. Plasmides	29
3. Culture cellulaire et transfection : Lignée immortalisée	30
4. Culture primaire neuronale	30
5. Expérimentation chez les cellules HEK (méthode ELISA)	31
6. Immunofluorescence neuronales et microscopie confocale	32
7. Quantification neuronale	33
8. Signalisation BRET2- EPAC	35
9. Construction du biosenseur EPAC	36
10. Analyse de données et statistiques	36
Résultats	37
1. Modulation de la production d'AMPc par le récepteur 5-HT _{4b}	37
2. Régulation de la signalisation du récepteur 5-HT _{4b}	40
a. Internalisation chez les cellules HEK	40
b. Internalisation dans les neurones	43
Discussion	56
Conclusion	63
Bibliographie	i

Liste des tableaux

Tableau I. Famille des récepteurs sérotoninergiques et mécanismes	14
Tableau II. Effet maximal et EC50 des agonistes utilisés dans la mesure de signalisation des récepteurs 5-HT4b chez les cellules HEK	40
Tableau III. Temps $\frac{1}{2}$ vie et efficacité des agonistes utilisés dans la mesure d'internalisation du récepteur 5-HT4b chez les cellules HEK.....	43
Tableau IV. Efficacité des agonistes utilisés dans la mesure d'internalisation du récepteur 5-HT4b chez les neurones. Les valeurs correspondent à l'asymptote maximale de la courbe cinétique d'internalisation.	55
Tableau V. Ordres d'efficacité des agonistes selon des différentes expériences réalisées.	58

Liste des figures

Figure 1. Neurotransmission sérotoninergique	4
Figure 2. Réponses aux effets antidépresseurs	5
Figure 3. Inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO)	7
Figure 4. Antidépresseurs tricycliques (ATC)	7
Figure 5. Activation des RCPGs (Source: Maurel Damien 2011)	11
Figure 6. Les récepteurs 5-HT ₄ : Une nouvelle cible de développement d'antidépresseurs	16
Figure 7. Voies de signalisation des récepteurs 5-HT	19
Figure 8. Architecture du domaine de la protéine Epac1	26
Figure 9. Courbe dose réponse de la production d'AMPC en fonction de la concentration de 5-HT	27
Figure 10. Marquage cytosolique d'un neurone (lavage acide)	33
Figure 11. Marquage cytosolique d'un neurone (lavage non acide)	34
Figure 12. Delta BRET des différents agonistes en fonction de leur concentration	39
Figure 13. Cinétique d'internalisation du récepteur 5-HT _{4b} dans les cellules HEK suite à stimulation par différents agonistes	42
Figure 14. Internalisation des récepteurs 5-HT _{4b} suite à stimulation par différents agonistes	44
Figure 15. Intensité moyen de marquage du cytoplasme pour les différents agonistes (lavage acide)	45
Figure 16. Internalisation des récepteurs 5-HT _{4b} suite à stimulation par différents agonistes	47
Figure 17. Intensité moyenne de marquage du cytoplasme pour les différents agonistes (sans lavage acide)	48
Figure 18. Internalisation des récepteurs 5-HT _{4b} suite à stimulation par différents agonistes pendant 15 minutes	50

Figure 19. Internalisation des récepteurs 5-HT _{4b} suite à stimulation par différents agonistes	51
Figure 20. Intensité moyenne de marquage du cytoplasme pour différents agonistes (sans lavage acide, 15, 30 et 60 minutes)	52
Figure 21. Intensité de marquage cytosolique exprimé en fonction du temps	54

Liste d'abréviations

5-HT	→	5-hydroxytryptamine (sérotonine)
AC	→	Adénylate cyclase
AD	→	Antidépresseur
AMP	→	Adénosine monophosphate
AMPC	→	Adénosine monophosphate cyclique
ATC	→	Antidépresseur tricyclique
ATP	→	Adénosine triphosphate
Ca ²⁺	→	Calcium
DA	→	Dopamine
GRK	→	G protein coupled receptor kinase
GTP	→	Guanosine triphosphate
HEK293	→	Human Embryonic Kidney 293
IBMX	→	Isobutylmethylxanthine
IMAO	→	Inhibiteur de monoamine oxydase
ISRS	→	Inhibiteurs sélectifs de recapture de sérotonine
K ⁺	→	Potassium
MAO	→	Monoamine oxydase
MAPK	→	Mitogen-activated protein kinase
ML	→	ML10302
NA	→	Noradrénaline
Na ⁺	→	Sodium
NRD	→	Noyau raphé dorsal
PKA	→	Protéine kinase A
PKC	→	Protéine kinase C
PLC	→	Phospholipase C
PRU	→	Prucalopride

R	→	Récepteur
RCPG	→	Récepteur couplé aux protéines G
RS	→	RS67333
SNC	→	Système nerveux central
SNP	→	Système nerveux périphérique
TPH	→	Tryptophane hydroxylase
ZACO	→	Zacopride

Introduction

Les problèmes et les malchances font partie intégrante de notre vie. Il nous arrive à tous parfois que les choses n'aillent pas comme prévu, qu'on ait une mauvaise journée, ou une mauvaise humeur. Ces expériences nous fatiguent, nous irritent et provoquent parfois des sentiments de culpabilité et de tristesse. Heureusement, ces sentiments ne sont que passagers et disparaissent au bout de quelque temps. Cependant, ce n'est pas le cas pour la maladie dépressive. La dépression devient maladie lorsque ses symptômes durent plusieurs semaines et viennent nuire à la vie sociale et au travail de l'individu. Certains sont génétiquement prédisposés à la dépression, mais plusieurs facteurs externes peuvent augmenter le risque. Par exemple un décès ou la maladie d'un conjoint, d'un ami ou d'un proche, une faible estime de soi, difficultés financières, problèmes de dépendance etc. De nos jours, il est généralement admis que divers facteurs génétiques, neurobiologiques et environnementaux sont en causes. Cette maladie présente plusieurs symptômes comme par exemple, une perte d'intérêt ou de plaisir par rapport à une activité qui pourtant était favorite, des difficultés à se concentrer et à prendre des décisions, fatigue et manque d'énergie. Santé Canada estime qu'il y aurait environ 11 % des hommes et 16 % des femmes qui feront une dépression majeure au cours de leur vie, ce qui est considérable et requiert une bonne quantité de ressources¹. Selon l'OMS (organisme mondial de la santé), la dépression majeure est la première cause d'incapacité au monde depuis les années 2000. Cette maladie entraîne plusieurs coûts en soins de santé ainsi qu'en perte de productivité au travail et ensemble, ont de profondes répercussions économiques. Par exemple, au Canada, les jours d'invalidité de courte durée attribuables à la dépression ont coûté quelque 2,6 milliards de dollars en 1998². Aujourd'hui, on cherche à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui déterminent la pathophysiologie de la dépression et président à l'action thérapeutique des médicaments antidépresseurs.

¹ Adresse URL : www.sc-hc.gc.ca, 12 septembre 2011

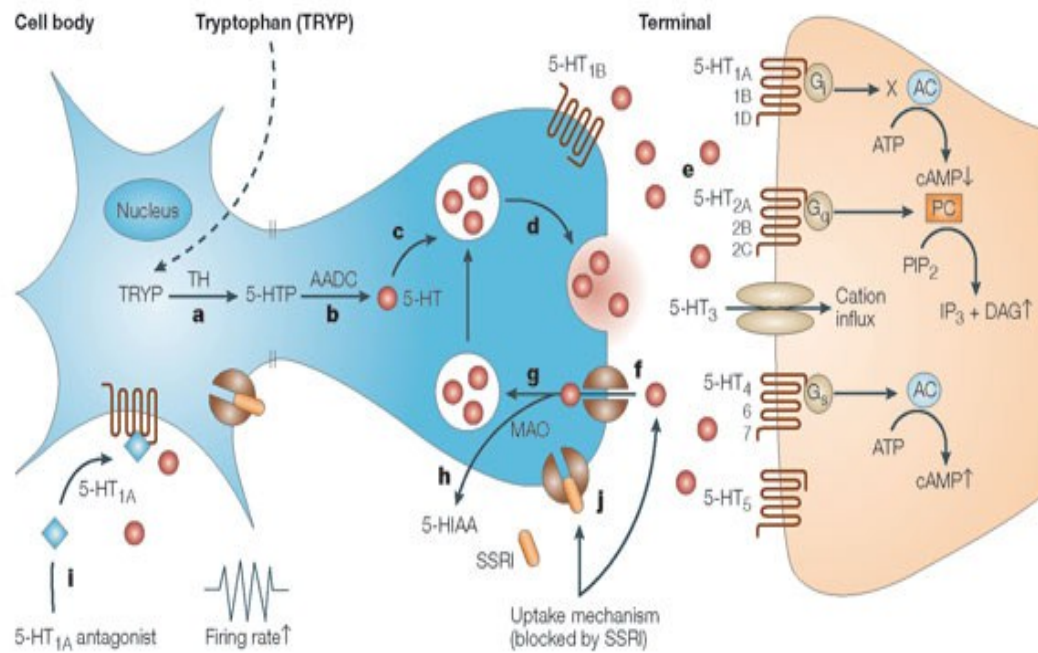
² Adresse URL : <https://dspace.ucalgary.ca/bitstream/1880/46454/1/RSS1Profil%20de%20la%20depression%20clinique%20au%20Canada.pdf>, Scott Patten, Heather Juby, 12 septembre 2011

I. Neurones monoaminergique

La noradrénaline (NA) et la dopamine (DA) sont synthétisés à partir de la tyrosine et de la phénylalanine. L'enzyme clef de cette synthèse est la tyrosine-hydroxylase. Pour sa part, la sérotonine (5-HT) est synthétisée à partir du tryptophane, un acide aminé qui sera acheminé vers le cerveau en traversant la barrière hémato-encéphalique. Seulement le tryptophane plasmatique libre, c'est-à-dire non lié à l'albumine, est en mesure de pénétrer dans le cerveau. La biosynthèse de la 5-HT est réalisée dans les neurones ou dans les cellules entérochromaffines et l'enzyme nécessaire à sa synthèse est la tryptophane-hydroxylase (TPH). On retrouve deux isoformes de la TPH, soit la TPH1 qui est exprimée dans le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) et la TPH2 qui est exprimée exclusivement dans les cellules neuronales et est l'isoforme prédominant dans le SNC. L'activité de l'enzyme dépend essentiellement de la disponibilité du substrat.

1. Transmission sérotoninergique

Suite à sa synthèse, la 5-HT est stockée dans des granules par l'intermédiaire de transporteurs vésiculaires, nommées VAMT-1 et -2, communs aux diverses amines. Ces amines sont acheminées vers l'extrémité axonale où elles sont stockées dans des vésicules. L'influx nerveux (exocytose calcium-dépendante) permet le relâchement de ces amines dans l'espace synaptique. Ces derniers se lieront à des récepteurs post-synaptiques spécifiques et permettront l'induction d'une cascade de signalisation nécessaire à la réponse cellulaire. Directement après la libération, des mécanismes d'élimination comme le catabolisme enzymatique et la recapture (étant le principal mécanisme pour terminer l'effet des monoamines) surviennent. La recapture des neurotransmetteurs se fait par transport actif sodium dépendant. La dégradation des monoamines fait intervenir deux types d'enzymes, soit la monoamine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT). Des autorécepteurs somatodendritiques et terminaux régulent la neurotransmission de ces monoamines.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 1. Neurotransmission sérotoninergique

- a) L'enzyme Tryptophane Hydroxylase (TH) régule la transformation du tryptophane (TRYP) en 5-hydroxytryptophane (5-HTP).
- b) L'enzyme Aromatic amino acid decarboxylase (AADC) régule la conversion du 5-HTP en 5-HT.
- c) La 5-HT est stockée dans des vésicules.
- d) Suite à l'influx nerveux, la 5-HT est relâchée dans la fente synaptique des vésicules membranaires.
- e) La 5-HT est libre de se lier à une multitude de récepteurs post-synaptiques.
- f) Recapture de la 5-HT par les transporteurs de 5-HT pré-synaptiques.
- g) La 5-HT est recapturée par les vésicules
- h) La 5-HT est dégradée par la monoamine oxydase (MAO).
- i) La 5-HT active les autorécepteurs pré-synaptiques somatodendritiques 5-HT_{1A}, responsable de la rétro-inhibition négative sur la fréquence de décharge.
- j) Inhibition des transporteurs de 5-HT par les inhibiteurs sélectifs de recapture de sérotonine (ISRS) [1].

II. Les antidépresseurs

1. Historique

Il existe aujourd'hui de nombreuses molécules que nous pouvons qualifier comme antidépresseurs (ADs). Les ADs sont des psychotropes qui sont destinés à éliminer les troubles de l'humeur et autres symptômes liés à la dépression. Les premiers médicaments pour traiter la dépression sont apparus en 1957. À l'époque, ils n'étaient pas très bien appréciés dû leur nombreux effets secondaires. Même aujourd'hui, l'efficacité des ADs est à discuter car selon des statistiques, il y aurait 20% des patients qui ne répondent pas au traitement pharmacologique, que 40% des patients répondent partiellement ou ne tolèrent pas les effets secondaires et que finalement, pour les patients qui répondent et qui tolèrent les effets secondaires, la latence de l'effet thérapeutique est prolongée et la rechute est commune suite à l'arrêt de la médication. Les ADs sont séparés en plusieurs familles distinctes et il existe au total une trentaine de médicaments différents.

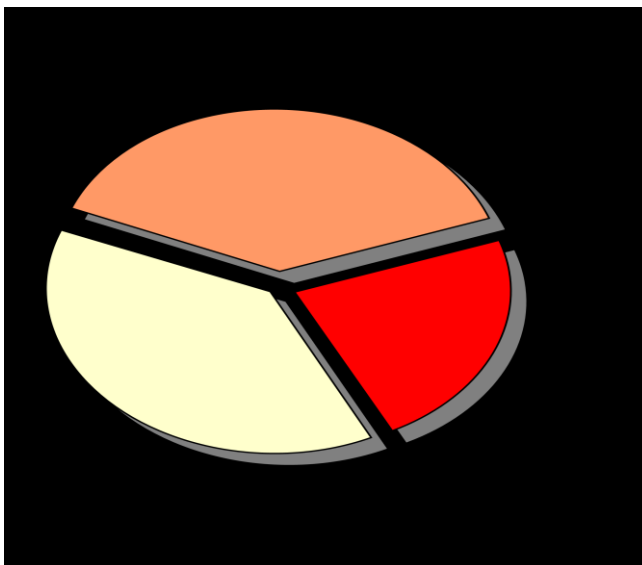


Figure 2. Réponses aux effets antidépresseurs

2. Types d'antidépresseurs

Au fil des découvertes, on a établi une classification des antidépresseurs en fonction de leur structure et de leur mode d'action. Ces derniers sont séparés en trois grandes familles principales sur lesquels nous allons développer : soit les inhibiteurs de la monoamine-oxydase (IMAO), les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et les tricycliques. Il y a aussi une certaine quantité d'antidépresseurs que l'on appelle « atypiques »; ces derniers n'ont pas de mécanismes d'action communs, mais augmentent l'efficacité de la neurotransmission monoaminergique.

a) Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO)

Les inhibiteurs de la monoamine oxydase sont parmi les premiers antidépresseurs à avoir été développés. Comme mentionné précédemment, les monoamines sont métabolisées par une enzyme qu'on appelle la monoamine oxydase. Bref, les IMAO, comme leur nom l'implique, inhibe cette enzyme et permettent d'augmenter la quantité de sérotonine et de noradrénaline disponible. Actuellement, les IMAOs de première génération ne sont pas utilisés en première intention pour traiter les épisodes dépressifs majeurs car ils entraînent de nombreux effets secondaires et des dangers associés à leur combinaison avec d'autres médicaments. De plus, avec la prise d'IMAO viennent de strictes restrictions alimentaires en ce qui concerne les aliments riche en tyramine (boissons alcoolisées, bananes, raisins, fromages, etc.) [2]. Cette substance est moins dégradée par les IMAO et peut causer de l'hypertension artérielle si elle devient présente en grande quantité. Ce type d'antidépresseur inhibe la MAO_A et/ou MAO_B de façon irréversible, mais leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques peuvent différer très largement. Des exemples connus d'antidépresseurs de ce type sont la phénelzine, la tranylcypromine et l'iproniazide (premier AD utilisé).

Il est maintenant connu qu'il existe une deuxième génération d'inhibiteurs réversibles (IRMA) qui posséderait moins d'effets secondaires. Un exemple d'inhibiteur de ce type est connu sous le nom de moclobemide.

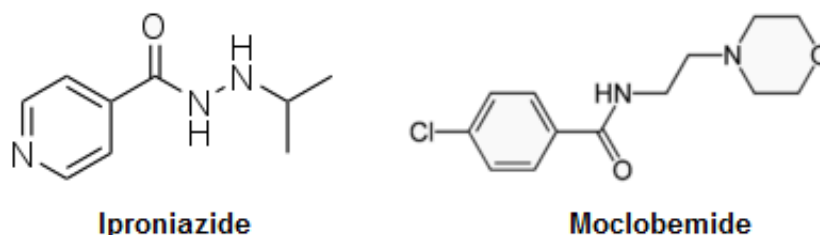


Figure 3. Inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO)

b) Les antidépresseurs tricycliques (ATC)

Ces derniers furent développés dans les années 1950-1960 et tiennent leur nom des trois anneaux de leur structure chimique. Ces antidépresseurs agissent principalement en bloquant les pompes à recapture des synapses sérotoninergiques et ou noradrénergiques. Bref, l'effet est d'augmenter la quantité de 5-HT ou de NA disponible dans la fente synaptique. Les ATC ont également une influence sur l'histamine et sur l'acétylcholine, ce qui explique de nombreux effets secondaires (bouche sèche, gain de poids, etc.). Ces derniers inhibent une multitude de récepteurs, c'est-à-dire les empêcher de bloquer les neurotransmetteurs. Des exemples connus d'antidépresseurs de ce type sont l'imipramine (Tofranil), l'amitriptyline (Elavil, Endep), la desipramine (Norpramine, Pertofrane) et la nortriptyline (Pamelor and Aventyl).

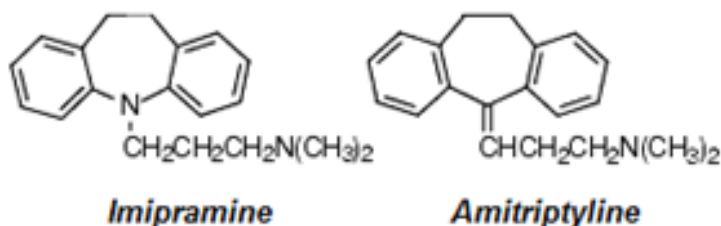


Figure 4. Antidépresseurs tricycliques (ATC)

c) Les inhibiteurs sélectifs de la Recapture de la Sérotonine (ISRS)

Les inhibiteurs sélectifs de recapture sont les antidépresseurs les plus récemment développés (entre 1970-1990) et les plus prescrits. Ces derniers sont déjà très connus du public grâce à la fluoxétine (Prozac), l'antidépresseur le plus fréquemment prescrit. Les ISRS diminuent la recapture de la sérotonine dans le neurone qui relâche les neurotransmetteurs pré-synaptiques en inhibant les transporteurs sérotoninergiques situés sur le corps cellulaire et sur les terminaisons nerveuses des neurones 5-HT. Ce type d'antidépresseur est différent des ATC car ils ne bloquent que les pompes à recapture de sérotonine. Toutefois, ils affectent indirectement la NA puisque ses niveaux sont intimement liés à ceux de la 5-HT. De façon générale, les ISRS produisent moins d'effets secondaires que les ATC ou IMAO car ils sont spécifiques à la 5-HT et n'influencent pas l'histamine, la tyramine ou l'acétylcholine. Les effets secondaires restants se présentent sous forme de nausées, baisse de libido et tremblements, mais disparaissent normalement suite au premier mois d'utilisation. L'augmentation du niveau de 5-HT finit toutefois par activer des autorécepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B,D} qui ont pour rôle respectif de diminuer la fréquence de décharge et de diminuer la libération de la 5-HT terminale [3]. Des exemples connus d'antidépresseurs de ce type sont la fluoxétine (Prozac), le citalopram (Celexa), la fluvoxamine (Luvox), la sertraline (Zoloft) et la paroxétine (Paxil). Ces substances sont aussi utilisées dans le traitement des troubles obsessionnels compulsifs, les attaques de panique et le syndrome de stress post-traumatique.

d) Les antidépresseurs atypiques (Nouvelle génération)

Ces derniers sont apparus vers la fin des années 90. Leur nom vient du fait que leur mécanisme d'action est différent des autres. Les antidépresseurs atypiques affectent les neurotransmetteurs, y compris la dopamine, la sérotonine et la norépinephrine. Des exemples connus d'antidépresseurs de ce type sont l'effexor (venlafaxine), le remeron (mirtazepine), le Desyrel (trazodone) et le Buspar (buspirone).

3. Mécanisme d'action des antidépresseurs

Le mécanisme d'action des antidépresseurs est largement centré sur leur impact synaptique. Une multitude d'arguments plaident en faveur que la dépression aurait sa propre neurobiologie, qui serait fondée sur les systèmes monoaminergiques. Tous les antidépresseurs ont une activité directe ou indirecte sur les neurotransmetteurs (essentiellement sérotoninergique (5-HT) et noradrénergique (NA)) ¹⁹ dans le but d'augmenter leur quantité dans certaines régions cérébrales. Lors d'une dépression, la neurotransmission de ces monoamines peut être diminuée chez certains patients, offrant ainsi aux thérapeutes une corrélation anatomo-clinique de la dépression qui peut s'expliquer par la « down regulation » des récepteurs bêta-adrénergiques et la diminution de production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). Bien sûr ce changement est l'un des nombreux possibles puisqu'il y a d'autres systèmes de neurotransmission plus ou moins impliqués dans la dépression comme par exemple le système GABA-ergique, le système dopaminergique, le système cholinergique et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Les antidépresseurs exercent une fonction thérapeutique en sur-activant CREB (cAMP-response-element-binding), puis, via une cascade d'évènements, entraînent la formation d'AMPc. Ce dernier arrive à la surface de la cellule et active les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), tout en particulier les récepteurs opiacés et monoaminergiques. L'activation de l'AMPc et de CREB entraîne la régulation de gènes spécifiques dans l'hippocampe, impliqués dans l'action des antidépresseurs. Le rolipram, inhibiteur sélectif d'inhibition de la phosphodiesterase IV, est une nouvelle classe d'AD qui agit en augmentant les niveaux intracellulaires d'AMPc. Ce dernier a été montré efficace comme antidépresseur chez des modèles animaux de la dépression [4]. Par ailleurs, l'activation directe des récepteurs sérotoninergiques post-synaptiques comme 5-HT₄ pourraient aussi entraîner une augmentation du niveau d'AMPc et de l'activité de CREB. Ces récepteurs ont la possibilité d'adopter différentes conformations actives selon le ligand qui l'occupe. Cette propriété pourrait nous permettre de développer des antidépresseurs avec une latence thérapeutique plus courte que celle des agents couramment disponibles.

III. Les récepteurs couplés aux protéines G

1. Historique

Les RCPGs forment une superfamille de protéines membranaires caractérisés par la présence de sept domaines transmembranaires. Ces derniers sont connectés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Ces récepteurs doivent leur appellation à leur capacité de couplage à des protéines hétérotrimériques liant le guanosine triphosphate (GTP), aussi appelées protéines G. Ces récepteurs constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires chez les mammifères, soit 3,4 % du génome. [5] [6]. Ces récepteurs jouent un rôle central dans le contrôle de la grande majorité des fonctions physiologiques et constituent une cible thérapeutique majeure. Les RCPGs répondent à un large éventail de produits chimiques, hormones et neurotransmetteurs. Il y a aussi les photons, les molécules endogènes, acides aminés et autres qui sont en mesure d'activer les RCPGs (Figure 5, p.11). Ces derniers n'exercent pas d'effet direct sur les canaux ioniques ou sur les enzymes. En fait, ils activent une protéine informative qu'on appelle la protéine G, laquelle amorce toute une série de signaux en cascade impliquant diverses enzymes. La protéine G transmet alors le signal à différents effecteurs intracellulaires permettant de générer la réponse cellulaire appropriée.

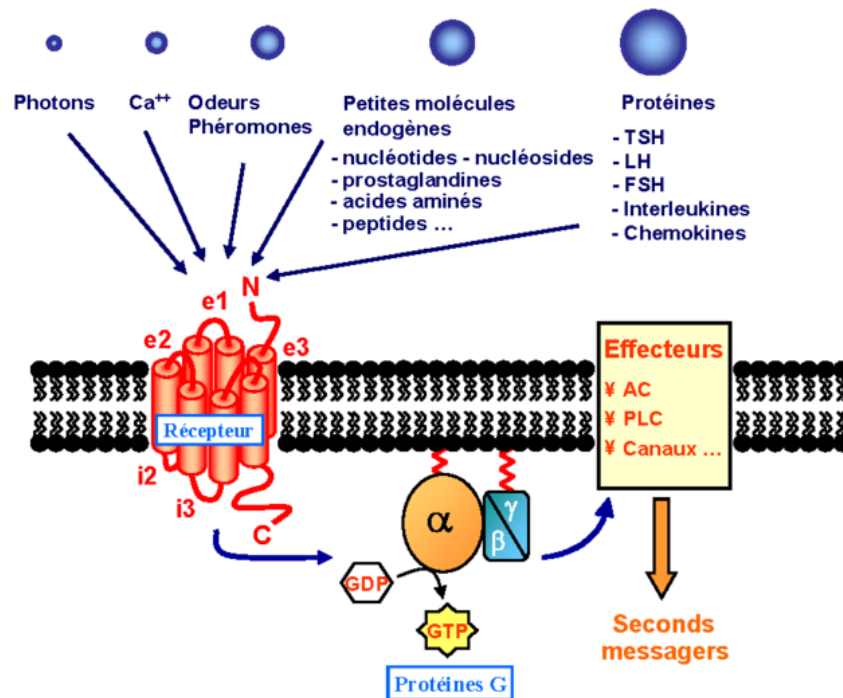


Figure 5. Activation des RCPGs (Source: Maurel Damien 2011)

Sur cette figure sont présentés différents types de ligands susceptibles de se coupler aux protéines G. La liaison d'un ligand sur la face extracellulaire du récepteur entraîne l'activation de la protéine $G\alpha$ au niveau intracellulaire. Dans le cas du récepteur 5-HT₄, le ligand est un neurotransmetteur (sérotonine) qui implique l'échange de GDP par GTP dans le but d'activer la protéine $G\alpha$ et de moduler l'efficacité de différents effecteurs dont l'adénylate cyclase et la phospholipase C.

2. La protéine G

Les protéines G sont des protéines cytosoliques qui s'attachent à la membrane et qui participent aux voies de transduction des signaux, en recevant ceux-ci d'un récepteur membranaire et en les transmettant vers un effecteur. On les appelle protéine G car elles utilisent l'échange de GDP et GTP pour déclencher ou inhiber des réactions biochimiques cellulaires [7]. Elles appartiennent au vaste groupe des GTPases et elles sont parfois désignées comme la «grande» protéine G.

Il y a aussi les «petites» protéines G comme les RAS, lesquelles possèdent des modifications post traductionnelles qui leurs permettent de s'ancrer dans la membrane et de se lier à GTP et GDP. Ces dernières sont impliquées dans la transduction de signaux.

Les protéines G sont activées par les RCPGs et sont constituées des sous-unités alpha (α), bêta (β) et gamma (γ). La sous-unité G_α lie une molécule de GDP au niveau de son domaine GTPase. Il existe au moins 20 différentes sous unités alpha, mais ceux dont nous discuterons sont G_{as} (stimulateur ou activateur de l'adénylate cyclase permettant d'augmenter la synthèse d'AMPc) et G_{ai} ou simplement G_i (inhibiteur de l'adénylate cyclase). On connaît aussi la sous-unité G_{aq} dont le rôle est de stimuler la phospholipase $C\beta$. Cette dernière, une fois activée, clive le phosphatidyl-inositol-4-5-diphosphate en inositol-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). À leur tour, ces deux seconds messagers agissent comme des effecteurs et suite à une série d'évènements, entraînent l'activation de la protéine kinase C (PKC). Bref, suite à l'activation d'un récepteur, la protéine G liée à ce dernier aura un effet excitateur ou inhibiteur via une cascade de signalisation sur la production d'AMPc. C'est l'enzyme adénylate cyclase (AC) qui, activée par la sous-unité G_{as} -GTP, synthétise l'AMPc (messenger secondaire) à partir de l'ATP. Suite à sa synthèse, l'AMPc interagit avec d'autres protéines pour induire une réponse cellulaire.

L'AMPc a comme rôle d'activer la protéine kinase A (PKA), qui à son tour phosphoryle différentes protéines essentielles au bon fonctionnement de la cellule, par exemple le facteur de transcription CREB et les canaux perméables au K^+ et Ca^{2+} . La régulation de la concentration intracellulaire en AMPc est contrôlée par l'équilibre entre sa synthèse (à partir de l'ATP) et sa dégradation rapide en 5'-AMP par une phosphodiesterase (PDE). Comme mentionné précédemment, certains récepteurs sont en mesure de contrôler la production d'AMPc en agissant via l'activation de protéines G spécifiques, capables de stimuler (G_s) ou inhiber (G_i) sa production.

3. Récepteurs sérotoninergiques et effets

La famille des récepteurs sérotoninergiques sont des récepteurs du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) activés par la 5-HT. Cette famille de récepteurs est subdivisée en 7 groupes distincts, soit 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ et 5-HT₇, chacun pouvant avoir des sous-classes (A, B, etc.). Certains récepteurs comme 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont en majorité situés sur le côté pré-synaptique et modulent la libération de 5-HT. Une partie des récepteurs 5-HT_{1A} sont post synaptiques et on les retrouve dans de nombreuses régions cortico-limbiques dont l'hippocampe. Pour leur part, les 5-HT_{1B} sont exprimés dans le système nerveux central et sont particulièrement concentrés dans les noyaux gris centraux (basal ganglia), le striatum et dans le cortex frontal. Certaines études suggèrent que les 5-HT_{1D}, bien que moins exprimé, soient retrouvés dans le noyau raphé [8], mais aussi dans le cœur, où ils modulent la relâche de la 5-HT. On retrouve les récepteurs 5-HT₆ au niveau du striatum, du noyau accumbens, de l'amygdale, l'hippocampe, du cortex et du tubercule olfactif. Pour leur part, les récepteurs 5-HT₇ possèdent une distribution vasculaire étendue et sont fortement exprimés dans l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et le cortex.

Les récepteurs sérotoninergiques sont liés aux protéines G selon diverses modalités, sauf pour le récepteur 5-HT₃ qui est un récepteur canal qui, à l'état ouvert, est perméable aux cations sodium et potassium. Nous discuterons donc des diverses modalités de liaison des récepteur à la protéine G, mais plus particulièrement sur les récepteurs 5-HT₄ qui ont été identifiés dans plusieurs tissus dans le SNC [9] et SNP [10]. La grande majorité des récepteurs 5-HT₄ sont exprimés dans le système limbique constitués de régions dont l'hippocampe, l'hypothalamus, le noyau accumbens, l'amygdale, les ganglions de base, le cortex frontal, l'aire septale, la substance noire et le striatus fundus. [9, 11-14]

4. Modalités de liaison des récepteurs 5-HT à la protéine G

Parmi l'ensemble des récepteurs de la famille 5-HT, on en retrouve quelque uns comme 5-HT₁ et 5-HT₅ qui sont couplés à la sous-unité G_{ai}. Ces derniers inhibent l'activation de l'AC et la production d'AMPc à travers la protéine inhibitrice G_{ai/o}. Ils sont responsables de l'ouverture de canaux K⁺ et de la fermeture de canaux Ca²⁺ afin de, respectivement, réduire l'excitabilité neuronale et réduire la libération de neurotransmetteurs [15]. Il y a ensuite les récepteurs couplés à la sous-unité G_{as} comme 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇. Ces derniers, suite à leur activation, stimulent l'AC afin d'augmenter la production d'AMPc. Même si nous n'allons pas en discuter, il est important de mentionner qu'il y a aussi une classe de récepteur qui est couplée à G_{aq}, soit 5-HT₂.

Famille	Type	Mécanisme
5-HT ₁	Couplé à protéine G _i /G _o	Diminue niveau cellulaire d'AMPc
5-HT ₂	Couplé à protéine G _q /G ₁₁	Augmente niveau cellulaire d'IP3 et de DAG
5-HT ₃	Récepteur canal perméable à Na ⁺ et K ⁺	Dépolarise membrane plasmique
5-HT ₄	Couplé à protéine G _s	Augmente niveau cellulaire d'AMPc
5-HT ₅	Couplé à protéine G _i /G _o	Diminue niveau cellulaire d'AMPc
5-HT ₆	Couplé à protéine G _s	Augmente niveau cellulaire d'AMPc
5-HT ₇	Couplé à protéine G _s	Augmente niveau cellulaire d'AMPc

Tableau I. Famille des récepteurs sérotoninergiques et mécanismes

IV. Les récepteur 5-HT₄

Les récepteurs 5-HT₄ sont exprimés dans de nombreux tissus dont le cœur, le cerveau et l'intestin et il a été démontré que les agonistes des récepteurs 5-HT₄ constituaient une nouvelle cible thérapeutique pour la dépression. Dans un modèle animal de la dépression, notre laboratoire a déjà démontré que les agonistes 5-HT₄ sont en mesure de réduire l'anhédonie [16]. Cette dernière est un symptôme majeur observé pendant un épisode dépressif. Plus précisément, on a ici observé la différence de consommation de sucrose entre des souris stressées de façon chronique et des souris non stressées.

Dans cette expérience, un agoniste du récepteur 5-HT₄, soit le RS67333, a été administré de façon sous cutanée et il a été observé que l'effet antidépresseur induit après seulement 3 jours était équivalent à l'administration d'un AD classique comme le citalopram pendant 2 semaines (Figure 6, p.16). De plus, on remarque que la durée de l'effet antidépresseur fourni par RS est équivalent à celui fourni par le citalopram. Bref, les animaux stressés (dont la prise de sucrose est moindre) ont, après seulement 3 jours, augmenté leur prise de sucrose et atteint le même niveau de consommation que les animaux non stressés. [16].

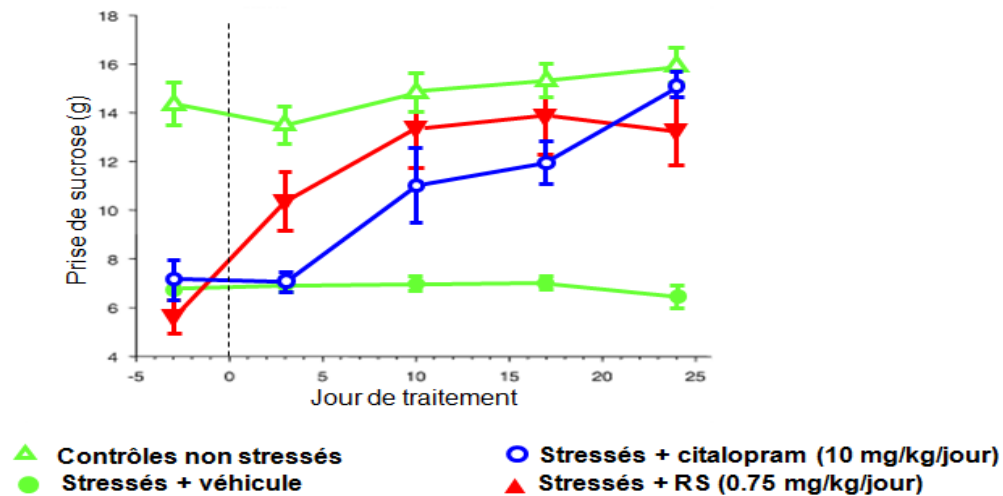


Figure 6. Les récepteurs 5-HT₄ : Une nouvelle cible de développement d'antidépresseurs

La prise de sucrose (g) des souris contrôle non stressée est plus élevée que celles stressées + véhicule. Un antidépresseur classique (citalopram 10mg/kg/jour) et un agoniste du récepteur 5-HT₄ (RS67333 0,75mg/kg/jour) ont été administrés à des souris de façon sous cutanée et en continu. En seulement 3 jours, la consommation de sucrose des animaux traités par l'agoniste RS67333 est équivalente à celle des animaux traités pendant une semaine par le citalopram. Figure modifiée de la Ref [16].

De plus, ces études ont permis de conclure que les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₄ produisaient des changements comportementaux, fonctionnels, électrophysiologiques, cellulaires et biochimiques similaires à ceux observés suite à un traitement chronique avec des ADs classique [16]. C'est par l'observation que l'effet maximal obtenu après 3 jours soit demeuré constant pendant plus de trois semaines que nous nous sommes intéressés au RS67333. La résistance à la tolérance que cet agoniste nous démontre est très intéressante et fait partie des mécanismes de régulation des récepteurs. Afin de pousser l'étude, il a d'abord fallu se pencher sur les différents isoformes du récepteur 5-HT₄.

1. Isoformes et distribution du récepteur 5-HT₄

Le récepteur 5-HT₄ possède cinq isoformes, soit 5HT₄ a, b, c, d et e. Au contraire de quelques des autres récepteurs sérotoninergiques couplés aux protéines G, qui sont négativement associés à l'adénylate cyclase, le récepteur 5-HT₄ est positivement associé à cet effecteur comme discuté précédemment. Sa stimulation enchaîne une cascade permettant d'augmenter le niveau d'AMPc et active la protéine kinase dépendante de l'AMPc. Ce type de récepteur est surtout retrouvé dans des régions du cerveau comme l'hypothalamus, l'hippocampe, le noyau accumbens, le pallidum ventral, l'amygdale, les ganglions de base, le cortex frontal, l'aire septale et la substance noire faisant tous partie du système limbique [17, 18]. Une équipe de chercheur a démontré en utilisant le PCR et l'analyse quantitative des niveaux d'ARNm qu'il y aurait une forte expression des isoformes a, b, c, g et n dans le SNC [19, 20]. Nous ne discuterons pas de l'ensemble des isoformes de la famille des récepteurs sérotoninergiques, mais nous allons nous concentrer sur les isoformes a et b. Le premier semble être fortement exprimé dans l'hippocampe, l'amygdale, le noyau accumbens et dans le noyau caudé. Pour sa part, l'isoforme «b» serait plus exprimé dans le noyau caudé, le putamen, l'amygdale et l'hypophyse. Dans les deux cas, les régions dans lesquelles on retrouve ces deux isoformes sont des régions impliquées dans les émotions liées aux phénomènes de la dépression. Cependant, du fait que l'isoforme «b» semble être la forme prédominante dans le SNC et en périphérie, nous avons utilisé ce dernier pour effectuer nos expériences.

2. Signalisation

Les récepteurs 5-HT₄ sont couplés positivement aux protéines G et leurs activations stimulent la voie de l'adénylate cyclase et de l'AMPc intracellulaire. Ces récepteurs stimulent aussi d'autres voies de signalisation comme par exemple la voie ERK qui est impliquée dans le contrôle de la mémoire et de l'apprentissage [21].

Nous allons cependant nous concentrer sur la voie de l'AC puisqu'elle semble être directement liée aux effets antidépresseurs. En fait, il a été démontré chez le rat que l'exposition à un stress chronique diminue le niveau d'expression du BDNF (brain derived neurotrophic factor) et, si l'exposition est persistante, conduirait à une éventuelle atrophie de l'hippocampe. De plus, il a été prouvé que l'atrophie de certaines structures limbiques comme l'hippocampe avait lieu chez des humains souffrant de dépression chronique [22]. On sait depuis peu que les antidépresseurs modulent l'expression et l'activation de certains facteurs de transcription comme le CREB (AMPc response element binding protein) et de facteurs neurotrophiques comme le BDNF. Bien qu'ils soient prescrits en grande quantité, les antidépresseurs actuels sont souvent accompagnés par un retard dans leur efficacité et d'effets secondaires variables. Le facteur de transcription CREB est une protéine ubiquitaire qui pourrait bien servir de point de convergence pour de multiples classes d'antidépresseurs car dans un modèle animal, il a été démontré qu'une hausse du niveau de CREB entraînait des comportements similaires à ceux induits par des antidépresseurs. Par ailleurs, des études post mortem indiquent que les niveaux de CREB sont augmentés chez les sujets prenant des antidépresseurs au moment de la mort. [23]

C'est ainsi que nous portons intérêt sur la voie de l'AC qui est responsable de la synthèse d'AMPc, laquelle active à son tour des enzymes comme la PKA qui phosphoryle des protéines spécifiques dont CREB. C'est en fait la sous-unité alpha de la protéine G qui se lie à une enzyme membranaire appelée adénylate-cyclase et met cet interrupteur cellulaire en marche. L'adénylate-cyclase est à présent capable de catalyser la synthèse d'une molécule particulière, en l'occurrence l'AMPc [24].

Le mécanisme par lequel les ADs peuvent stimuler le BDNF implique l'AMPc et le facteur de transcription CREB impliqué dans la régulation de la neurogénèse et de la neuroplasticité (Figure 7, p.19). L'activation de l'AMPc et de CREB entraîne la régulation de gènes spécifiques dans l'hippocampe, impliqués dans l'action des ADs. Pour faire un retour sur l'AC, il faut savoir qu'elle est généralement activée ou réprimée en réponse à l'activation par un ligand (hormone, neurotransmetteur) d'un RCPG. L'AMPc est donc un intermédiaire essentiel dans les cascades de voies de transduction intracellulaires.

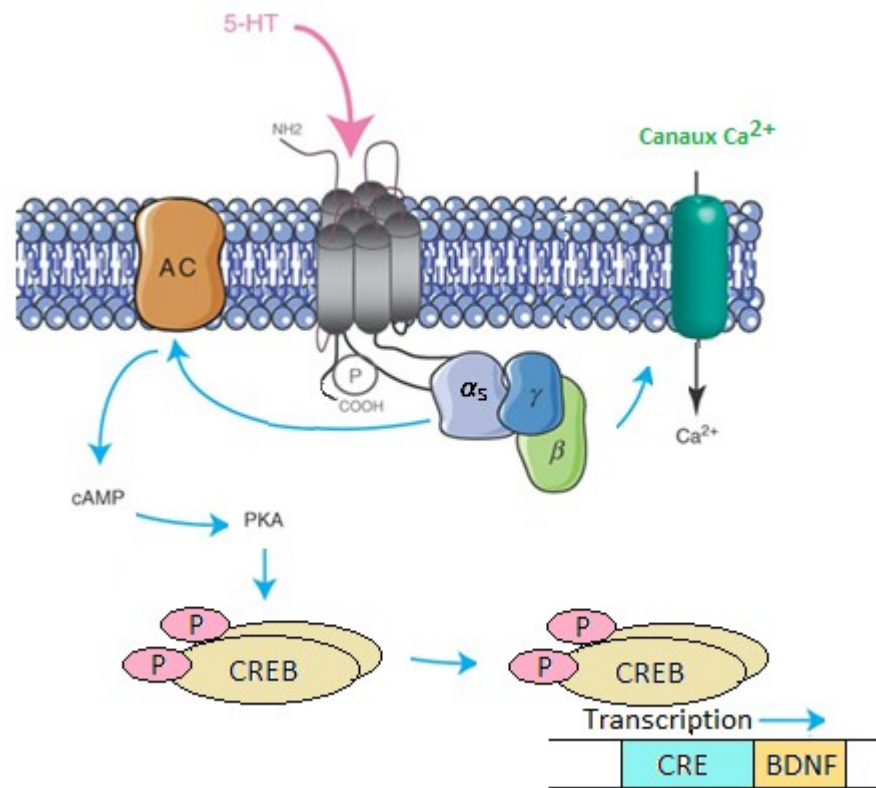


Figure 7. Voies de signalisation des récepteurs 5-HT

Les récepteurs 5-HT sont couplés via Gs à l'adénylate cyclase, lequel, suite à son activation par un ligand, est responsable de la synthèse d'AMPc à partir d'ATP. À son tour, l'AMPc active des enzymes comme la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle des protéines spécifiques dont CREB. Cette dernière agit en tant que facteur de transcription qui interagit directement avec l'ADN par sa fixation aux éléments de réponse CRE (élément de réponse d'AMPc). Il existe aussi d'autres voies de signalisation comme la modulation des canaux calciques. Figure modifiée par S.Younes.

3. Régulation des récepteurs couplés aux protéines G

a) Désensibilisation et internalisation

Une caractéristique importante des RCPG est leur capacité de moduler leur capacité de signalisation. Mais, suite à l'activation d'un RCPG par un agoniste, non seulement les voies de signalisation sont déclenchées, mais aussi des voies de régulation qui permettent de contrôler la durée d'activation des récepteurs de façon à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur comme la désensibilisation de ce dernier. Pour être effective, cette régulation nécessite un découplage physique entre le récepteur et la protéine G et pour s'y faire, le récepteur doit d'abord être phosphorylé sur des résidus sérine/thréonine localisés à l'extrémité C-terminale et est responsable de la réduction de leur capacité de signalisation [25] [26]. Les protéines susceptibles de réaliser cette phosphorylation sont les PKA, PKC et les GRK (G protein receptor kinase). Les GRK sont des protéines qui phosphorylent le récepteur dans sa conformation active stabilisée par l'agoniste [27] tandis que PKA et PKC sont activés par les seconds messagers dont AMPc, calcium et DAG [28]. De façon plus concrète, la phosphorylation se traduit par le recrutement de la β -arrestine à la membrane plasmique, laquelle prend probablement la place de la protéine G sous le RCPG et permet la formation de puits recouverts de clathrine, indispensables à l'internalisation du récepteur [29].

b) Triage post endocytaire

Une fois le récepteur internalisé, il peut suivre deux voies distinctes, soit vers les endosomes de recyclage ou vers le compartiment lysosomal. Le milieu acide des endosomes favorise la dissociation entre le ligand et le récepteur. Ce dernier sera alors resensibilisé, c'est-à-dire de reprendre sa conformation inactive pour ensuite être déphosphorylé par des phosphatases et finalement être recyclé à la membrane plasmique.

Une désensibilisation prolongée des récepteurs entraînerait l'incapacité pour la cellule de répondre de façon appropriée aux signaux extracellulaires, c'est pour cette raison que la resensibilisation vient en jeu. L'observation, selon laquelle l'activation des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₄ entraîne des réponses antidépressives rapides dans des modèles précliniques, s'avère très encourageante considérant que la latence à l'effet thérapeutique est l'un des problèmes majeurs dans la dépression comme discuté précédemment. Ces récepteurs jouent un rôle central dans le contrôle de la grande majorité des fonctions physiologiques et constituent une cible thérapeutique majeure.

c) Tolérance et latence thérapeutique

De façon générale, les ligands thérapeutiques, qui produisent leurs effets bénéfiques par l'activation des RCPG, développent de la tolérance. Ce phénomène correspond à une stimulation où des concentrations supérieures d'un médicament sont requises pour obtenir une même réponse biologique. Elle peut être liée à une modification pharmacocinétique qui implique une augmentation du métabolisme du médicament ou une modification pharmacodynamique, laquelle implique une désensibilisation des récepteurs. Ce phénomène de tolérance à une drogue peut se développer pour tous ses effets pharmacologiques ou seulement à une partie d'entre eux. Elle peut d'ailleurs entraîner une tolérance à d'autres drogues appartenant à la même classe pharmacologique.

Le délai de l'action clinique des ADs résulte de mécanismes neurobiologiques d'adaptation secondaires à l'activation de cible pharmacologique initiale. Ceci est une problématique lorsqu'on considère que la dépression, étant une maladie chronique, nécessite une médication permanente. Il est donc crucial de développer de nouveaux ADs ayant une meilleure efficacité thérapeutique et un faible délai de latence. C'est ainsi que nous sommes intéressés aux agonistes des récepteurs de type 5-HT₄ puisqu'ils ne semblent pas déclencher ce type d'adaptation [30]. Par ailleurs, plusieurs études supportent l'existence de divers états conformationnels de ces récepteurs stabilisés par les ligands.

En fait, le caractère dynamique des RCPGs est essentiel à leur bon fonctionnement. Il est connu que la liaison du ligand stabilise une certaine conformation du récepteur (forme tridimensionnelle de la protéine du récepteur, sans changement dans la séquence).

4. Théorie pharmacologique et sélectivité fonctionnelle

Il a déjà été montré que différentes conformations interagissaient de façon distincte avec les protéines de régulation des RCPGs. Afin de répondre à la masse croissante de preuves pour plusieurs états conformationnels dans des considérations théoriques, différents modèles ont été proposés. Un de ces modèles propose que chaque agoniste pourrait promouvoir sa propre conformation active du récepteur, conduisant ainsi à un nombre presque illimité de conformations possibles des récepteurs. Un second modèle suggère qu'il pourrait y avoir un nombre limité de conformations actives dans lequel différents agonistes pourraient induire un changement de conformation [31] [32]. Dans une expérience, le ligand favorisant le retour du récepteur à la membrane produisait moins de désensibilisation et moins de tolérance que le ligand favorisant la séquestration du récepteur [33]. Un récepteur peut ainsi adopter différentes conformations actives selon le type d'effecteur présent et par conséquent, afficher différentes interfaces permettant l'accès à certains ligands spécifiques. Ces derniers possèdent bien sûr une affinité distincte selon l'interface que le récepteur affiche. Autrement dit, un ligand stabilise une conformation du récepteur et peut donc avoir un profil pharmacologique différent selon le type de conformation du récepteur qu'il stabilise. Il est possible d'utiliser des ligands favorisant spécifiquement les voies de signalisation propres aux effets bénéfiques d'un médicament au détriment de ceux entraînant des effets secondaires. Autrement dit, la sélectivité fonctionnelle permet de cibler la voie de signalisation responsable des effets thérapeutiques et de minimiser l'activation des voies entraînant les effets indésirables. C'est sous cette optique que la sélectivité fonctionnelle est une propriété importante que nous pouvons exploiter dans le but d'améliorer l'efficacité d'un médicament.

Une méthode permettant de s'y prendre est de mesurer l'ordre d'efficacité de différents ligands agissants sur un même type de récepteur à travers deux principales voies, soit la production d'AMPc et l'internalisation des récepteurs. Selon la théorie classique, les paramètres utilisés pour mesurer l'action des différentes drogues sont l'EC50 et l'efficacité, lesquels permettront d'établir une mesure quantitative de l'ordre d'efficacité entre les différents agonistes. L'EC50 est simplement une mesure de la concentration d'un agoniste qui provoque une réponse à mi-chemin (médiane) entre la ligne de base et l'effet maximum. Il représente donc la concentration d'un composé lorsque 50% de l'effet maximal est observé. L'EC50 est couramment utilisé comme mesure de puissance d'un médicament. Pour sa part, l'efficacité est le terme utilisé pour décrire l'intensité de l'effet de drogues, quelle que soit la dose administrée. En pratique, plus la concentration (in vitro) ou la dose (in vivo) d'un médicament nécessaire à induire une réponse est faible, plus sa puissance est élevée. L'efficacité d'une drogue dépend de plusieurs facteurs dont la densité des récepteurs, l'affinité de la drogue pour un récepteur et de sa capacité à induire une conformation du récepteur qui favorise la production d'effets mesurables. Le concept d'efficacité provient du fait que la relation entre l'occupation des récepteurs par une drogue et la réponse fonctionnelle médiée par le récepteur ne suivent pas toujours une relation linéaire. Ainsi, un médicament très efficace est capable de stimuler une réponse maximale tout en occupant seulement une petite fraction des récepteurs disponibles. Au contraire, un médicament dont l'efficacité est faible peut stimuler une réponse submaximale même à l'occupation des récepteurs à 100%. [34]

V. Méthodes expérimentales utilisées pour étudier l'activation et la fonction des RCPGs

La méthode de bioluminescence par résonance de transfert d'énergie (BRET) a été récemment développée et est probablement l'innovation la plus importante dans le domaine des fluorophores [35]. Elle fut marquée par la découverte d'une protéine fluorescente, la Green Fluorescent Protein (GFP) pouvant être directement encodée dans la cellule. Cette technique est dérivée d'un processus biologique naturel par lequel l'énergie émise (485nm) par une luciférase excitée (donneur) est transmise à une GFP (accepteur), qui à son tour émet une lumière de longueur d'onde supérieure (530nm) qu'on appelle la fluorescence. Autrement dit, la *Renilla*luciférase (RLuc) est fusionnée à une protéine d'intérêt et la GFP est fusionnée à une seconde protéine d'intérêt qui est susceptible d'interagir avec la première. Il est aussi possible d'effectuer le BRET de façon intramoléculaire, c'est-à-dire d'inclure ces deux marqueurs sur une même protéine.

Cette énergie sera absorbée par l'accepteur s'il se trouve à l'intérieur d'un rayon d'environ 100Å (ou 10 nm), ce qui est comparable avec les dimensions des macromolécules biologiques. L'obtention d'un signal à 485nm nous indique qu'il n'y a aucune interaction entre les deux protéines puisqu'on détecte seulement le signal émis par la luciférase. Dans le cas contraire, on pourra mesurer un signal supplémentaire puisque la GFP émet à 530nm.

L'efficacité du transfert dépend du degré de chevauchement spectral, de l'orientation relative et de la distance entre le donneur et l'accepteur. Considérant que le donneur BRET est une protéine bioluminescente qui émet de la lumière à courte longueur d'onde et à forte énergie, implique que les pics de lumière émise par l'accepteur et par le donneur seront suffisamment distancés pour minimiser le chevauchement des longueurs d'ondes. De cette façon, on obtient un signal résultant plus précis. Ce dernier est en fait un ratio entre la lumière émise par l'accepteur et celle émise par le donneur et est établi comme étant le «ratio BRET».

Cette technique de transfert d'énergie par résonance est rapide et la lecture des résultats se fait en seulement quelques minutes. De plus, l'interprétation des résultats est simple et la méthode est peu coûteuse. Ce système est donc idéal pour étudier les interactions protéine-protéine dans les cellules vivantes. Cette nouvelle technologie a été appliquée dans un large éventail d'applications intéressantes dans le milieu universitaire comme dans la découverte de médicaments [36] [37].

1. Biosenseur EPAC

La protéine Epac est activée par la liaison de l'AMPc et elle catalyse l'échange de GDP pour GTP afin d'activer la protéine G Rap, une GTPase appartenant à la famille des Ras. Elle représente une nouvelle cible pour l'AMPc et un GEFs (facteur d'échange du nucléotide guanine) pour la petite GTPase Rap. La présence de site de liaison à l'AMPc sur ces protéines facilite leur activation directe par l'AMPc, indépendamment de l'activation de PKA (cible classique et directe de l'AMPc) [38] [39]. L'AMP cyclique est un second messenger qui induit des réponses physiologiques comme la croissance et la différenciation pour la régulation hormonale, neuronale, et immunologiques [38] [39]. Il a été récemment suggéré que la protéine Epac1 serait impliquée dans la régulation de canaux ioniques AMPc dépendants comme la signalisation intracellulaire de Ca^{2+} , l'exocytose et l'activité des transporteurs d'ions. Dans le cerveau, il est impliqué dans la mémoire et dans les fonctions cognitives [40]. L'ARNm de Epac1 est largement exprimé dans le système nerveux central et particulièrement au niveau du striatum. Il est aussi fortement exprimé au niveau de la thyroïde, des reins, des ovaires et de l'utérus. Pour sa part, Epac2 semble être limitée au niveau du SNC, au pancréas et aux glandes surrénales [38] [39]. De plus, la protéine Epac2 possède un domaine de liaison à l'AMPc supplémentaire dans sa région N-terminale qui peut lier l'AMPc avec une faible affinité. [41]

L'outil utilisé pour quantifier la production d'AMPc est un bio senseur basé sur la protéine Epac1 discuté précédemment. Ici nous réutilisons le principe de la méthode BRET intramoléculaire, mais cette fois avec la protéine Epac1 sur laquelle nous avons étiqueté les deux marqueurs, soit l'accepteur (GFP) et le donneur (RLuc). Bref, la présence de ces deux marqueurs nous permet d'obtenir un signal luminescence/fluorescence afin de mesurer la production d'AMPc.

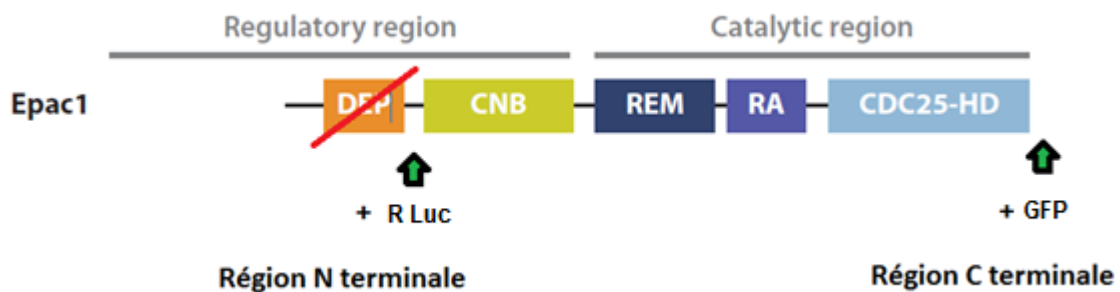


Figure 8. Architecture du domaine de la protéine Epac1

La région régulatrice contient un domaine CNB (cyclic nucleotide-binding) ainsi qu'un domaine DEP (Disheveled, Egl-10, and Pleckstrin). C'est dans la région catalytique qu'on retrouve le domaine CDC25-HD (CDC25-homology domain) qui est stabilisé par le domaine REM (Ras exchange motif) et par le domaine RA (Ras-association). Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2010.50:355-375, Modifié par S. Younes.

Suite à la liaison de l'AMPc sur Epac1, la conformation de la protéine est changée et les sites N et C terminal s'éloignent l'un de l'autre. De cette façon, l'éloignement des deux régions terminales nous mène vers une baisse du signal (indiquant une hausse de la production d'AMPc).

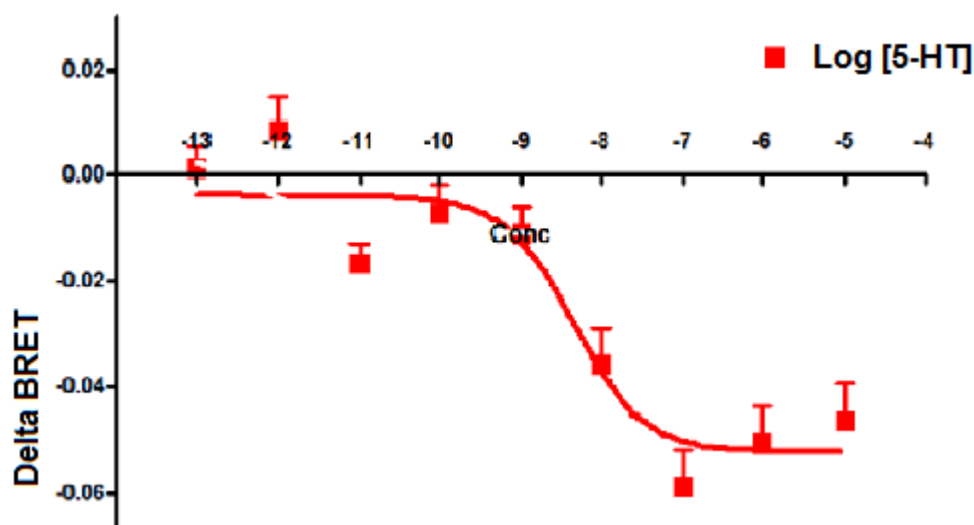


Figure 9. Courbe dose réponse de la production d'AMPc en fonction de la concentration de 5-HT

Nous observons ici une courbe Delta BRET (unité nous permettant de mesurer la production d'AMPc) en fonction de la concentration de l'agoniste 5-HT. Le signal BRET est calculé comme le rapport de la lumière émise par l'accepteur (GFP10) sur la lumière émise par le donneur (RLucII). Ce rapport est nommé le «Ratio BRET». Les valeurs sont ensuite corrigées en éliminant l'auto-fluorescence émise par RLucII afin d'obtenir le «NetBRET». L'axe Y du graphique représente le «DeltaBRET», étant le «NetBRET» après avoir éliminé le signal obtenu par les cellules non traitées «background». Cette figure est en quelques sortes contre intuitive puisque plus le Delta BRET est faible, plus la production d'AMPc est importante. Afin d'y remédier, nous avons inversé la courbe réponse dans la section «Résultats» (voir Figure 12, p.39) afin qu'une hausse du DeltaBRET représentera une hausse d'AMPc. Les détails et explications par rapport à la méthode utilisée pour produire cette expérience sont inscrits dans la section «Matériel et Méthodes». Les résultats représentés ci-dessus sont une moyenne d'au moins 10 expériences.

Hypothèse et objectifs

Dans un modèle animal de la dépression, nous avons observé que l'agoniste RS67333 produit un effet antidépresseur et qu'il y a d'autres agonistes du même récepteur qui n'en produisent pas, soit par exemple le prucalopride [16].

Étant donné que l'efficacité du Prucalopride à stimuler les 5-HT₄Rs est similaire sinon plus grande que celle de RS67333, nous avons énoncé l'hypothèse que le récepteur 5-HT₄ pourrait adopter différentes conformations actives suite à son activation par différents agonistes.

Nous avons ainsi décidé d'explorer les principales réponses fonctionnelles des récepteurs 5-HT₄ en observant leurs propriétés de régulation et de signalisation. Plus particulièrement, nous regarderons l'internalisation et la production d'AMPC du récepteur 5-HT_{4b} suite à activation par divers ligands dans le but d'établir une corrélation par rapport au RS67333.

Matériel et méthodes

1. Réactifs

Les éléments qui suivent ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, États-Unis) : les sels utilisés pour le tampon PBS, l'isobutylmethylxanthine (IBMX), l'anticorps anti-FLAG M1 ainsi que le substrat o-phenylenediamine dihydrochloride, l'acide ascorbique, la poly-L-lysine et la sérotonine (5-HT). Le RS67333, ML10302 et Zacopride proviennent de Tocris Bioscience (Minneapolis, MN, États-Unis). Le prucalopride est un cadeau de Shire. Les réactifs reliés à la culture cellulaire tels le milieu DMEM, le sérum de veau foetal, le sérum de veau bovin, la glutamine, la pénicilline, la trypsine et la streptomycine proviennent de Wisent (St-Bruno, QC, Canada). La BSA provient d'EMD chemicals (San Diego, CA, États-Unis). L'anticorps Alexa 488 provient d'Invitrogen et l'anticorps (HRP) anti-souris a été fourni par Amersham Biosciences. La polyéthylénimine (PEI) provient de Polysciences, Inc. (Warrington, PA, États-Unis). La coelentérazine provient de Nanolight Technology (Pinetop, AZ, États-Unis). L'anticorps anti-HA provient du Dr. L.E Trudeau (département de pharmacologie, Université de Montréal). Le Tris provient de MD Biomedicals, LLC (Aurora, OH, États-Unis). L'ensemble des pétris et tubes utilisés proviennent de chez Sarstedt (Montréal, Qc, Canada). Le chlorure de sodium (NaCl) a été fourni par ACP Chemicals (Montréal, QC, Canada). Les plaques de 96 puits proviennent de Perkin-Elmer (Massachusetts, États-Unis).

2. Plasmides

Les isoformes 5-HT_{4b} proviennent de Missouri S&T cDNA Resource Center. Le 5-hydroxytryptamine du récepteur 4 (HTR4), la variante B (type sauvage) ont été clonés dans pcDNA3.1 + (Invitrogen) à EcoR1 (5') et XhoI (3'). Le cadre ouvert de lecture a été amplifié par PCR à partir d'ADNc de cerveau humain (Clontech). L'insert a été séquencé et correspond au consensus énumérés pour "HTR4 B, Isoforme" avec l'exception suivante: un SNP silencieux (C112T). La taille de l'insert est de 1167pb.

3. Culture cellulaire et transfection : Lignée immortalisée

Les cellules embryonnaires humaines de reins (HEK) 293 ont été cultivées dans du milieu de base supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal, de 1 mg/mL de streptomycine, de 1000 unités/100mL de pénicilline et de 5mM de glutamine. Les cellules ont été conservées dans un incubateur à 37°C contenant 5% de CO₂. Les essais ELISA ont été effectués sur une lignée de cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur 5-HT_{4b}. Elles ont été produites par transfection avec 4µg d'ADNc (par pètri de 100 mm) du récepteur HA-5HT_{4b} puis sélectionnées à l'aide de 500 µg/mL de G418. La transfection pour les essais d'accumulation d'AMPc ont requis la polyéthylamine et 0,4µg de GFP10-EPAC-RLucII par pètris de 100mm. Les pètris contrôles ont été transfectés avec 0,32µg RLucII et serviront à éliminer l'auto-fluorescence émise par RLucII. Avant chacune des expériences, le sérum a été retiré de chacun des pètris et remplacé par un volume équivalent de milieu de base, et ce, au moins 16 heures avant le commencement de l'expérience. Cette étape permet de s'assurer qu'il n'y a pas de traces de 5-HT dans le milieu qui pourrait désensibiliser les récepteurs.

4. Culture primaire neuronale

Les cultures ont été préparées à partir du cortex préfrontal du rat post natal comme détaillé dans le protocole suivant [42]. Brièvement, les animaux ont été cryoanesthésiés, leur cerveau a été retiré et le cortex préfrontal a été disséqué afin de le faire digérer dans une solution de papaïne (40 min, 37°C). Les cellules ont ensuite été détachées mécaniquement, puis resuspendue à une densité de 2×10^6 /mL. Ces dernières sont ensuite placées sur des plaques de verres préalablement induite de poly-L-lysine. Les cellules ont été conservées dans un milieu neurobasal A supplémenté de vitamine B27, pénicilline/streptomycine, glutamax et 10% (v/v) FBS. Suite à 24 heures d'incubation, les cultures ont été transfectées avec 6 µg du récepteur 5HT_{4b} en utilisant la précipitation du phosphate de calcium. [43]

5. Expérimentation chez les cellules HEK (méthode ELISA)

La quantification de l'internalisation des récepteurs s'est effectuée à l'aide de la technique ELISA adaptée [44]. Les cellules sont d'abordensemencées (150 000 à 200 000 cellules/puits dans des plaques de 24 puits préalablement induite de poly-L-lysine. Le jour de l'expérience, 5-HT, RS67333, ML10302, Zacopride et Prucalopride sont introduits indépendamment à concentration fixe (10uM) dans les puits pour les temps indiqués (5, 10, 30, 60 et 90 minutes). L'internalisation a été arrêtée par l'addition de PBS (4°C, sur glace). Après les lavages, les cellules ont été fixées par l'ajout de paraformaldéhyde (3%, 15 min, 4°C). Suite à la fixation, les cellules sont lavées 2 fois avec du DMEM basic (37°C). Le blocage des sites non spécifiques s'effectue avec PBS/BSA 1% (30 mins, RT). Les cellules ont ensuite été incubées en présence de l'anticorps primaire Anti-Flag M1 (1 :1000 dans PBS/BSA 1%, 60 mins, RT), lavées avec PBS/BSA 1% (RT, 2 minutes) et incubées avec l'anticorps Anti-Souris HRP (Horseradish peroxydase) 1/8000 dans PBS/BSA 1%, RT, 30 minutes)). Après deux lavages (PBS/BSA 1%, RT, 2 min), 200uL du substrat SIGMA FAST™ OPD sont ajoutés dans chacun des puits pour un temps maximal de 12 minutes après lequel la réaction est arrêté avec 50uL de HCl 3N. L'ensemble des puits contenant les cellules ont été transférés sur une plaque de lecture à 96 puits pour une lecture à 492nm. Le lecteur de plaques est un Victor; Perkin Elmer qui évalue le niveau de coloration de chacun des puits par mesure de densité optique (DO) suite à une courte incubation en présence du substrat. Le signal mesuré est généré par les récepteurs en surface, tandis que les récepteurs internalisés ne produisent pas de signal. Afin de mesurer le niveau d'internalisation, nous devons soustraire le signal obtenu suite aux traitements du signal de départ provenant des récepteurs présents à la surface avant traitement. Bref, la différence de signal nous donnait un indice du niveau d'internalisation et sachant que le niveau de coloration est inversement proportionnel à l'internalisation du récepteur, nous pouvions mesurer le niveau d'internalisation en fonction du temps.

6. Immunofluorescence neuronales et microscopie confocale

Des neurones ont été cultivés en suivant le protocole de culture primaire neuronale puis transfectés avec le récepteur HA-5HT_{4b} [43]. Le jour de l'expérience, les cellules ont été incubées en présence de l'anticorps primaire Anti-HA (1 :1000, 37°C, 30 mins). Les cellules sont ensuite lavées puis incubées avec les différents agonistes (10uM, 37°C) pendant 15, 30 ou 60 minutes. L'arrêt du traitement s'effectue avec du PBS (4°C) suivi d'un second lavage. Ce dernier a été effectué de deux façons différentes; soit par lavage acide ou non. Dans le premier cas, une solution de NaCl (150 mM) et d'acide acétique (200 mM) est utilisé et permet de retirer tout anticorps de surface des récepteurs non internalisés alors que dans la deuxième méthode, nous avons utilisé du PBS/BSA 1%. Dans les deux cas, les cellules sont ensuite fixées à l'aide du paraformaldéhyde (3%, 15 min, 4°C) puis perméabiliser avec 0,1% Triton X-100 (15mins). Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois (PBS-BSA 1%, 1min) et exposées à l'anticorps secondaire (Alexa 488) conjugué à un fluorochrome (1 :1000, RT). Finalement, les cellules ont été bien lavées et les lamelles ont été montées sur des lames en utilisant le milieu « mounting » (Immuno-Mount). Le modèle de microscope utilisé est un Olympus 1X81 équipé d'un système confocal DSU (Disk scanning unit). Les images de neurones ont été analysées et quantifiées à l'aide du programme Image J permettant de mesurer l'intensité et les aires de surface. Les quantifications nous ont permis de distinguer l'effet des agonistes sur l'internalisation des récepteurs 5-HT_{4b} dans les neurones.

7. Quantification neuronale

Ci-dessous est représenté un neurone qui internalise les récepteurs 5-HT_{4B} suite à activation par un agoniste. La partie marquée par fluorescence représente l'ensemble des récepteurs 5-HT_{4B} ayant été internalisé dans le neurone. Un fort marquage indique une forte internalisation des récepteurs à cet endroit et vice-versa. Le processus à suivre pour marquer les neurones consiste d'abord à augmenter la luminosité et contraste de l'image afin de bien distinguer le marquage du «background». Le tracé externe et le tracé interne délimitent respectivement la limite externe du neurone ainsi que son noyau. La différence entre le marquage externe et celui du noyau donne l'intensité de marquage cytosolique.

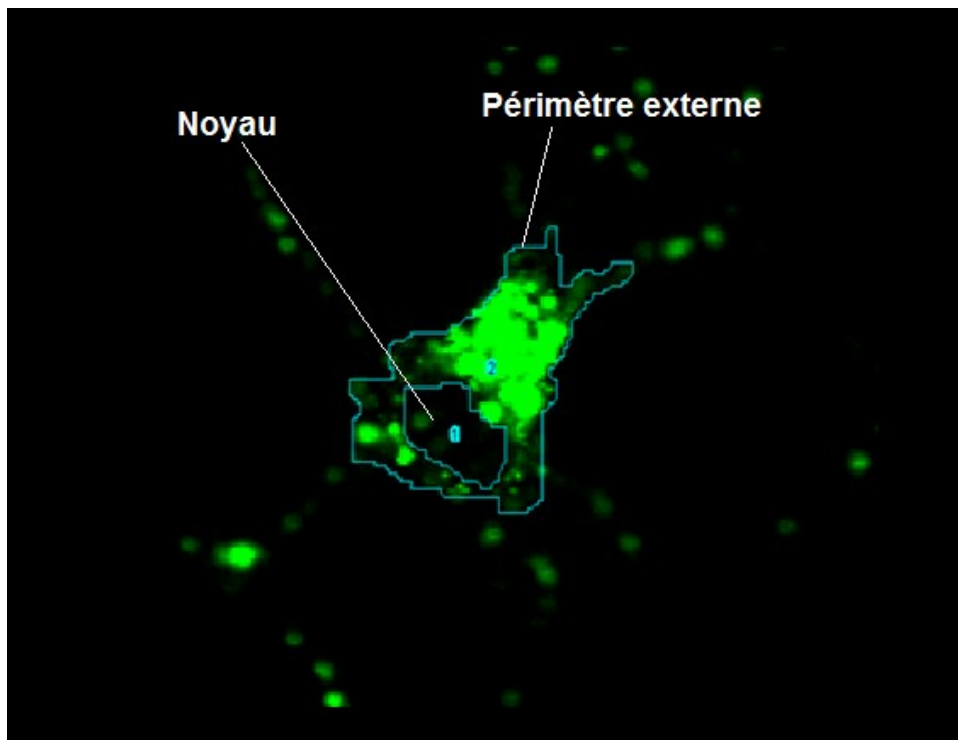


Figure 10. Marquage cytosolique d'un neurone (lavage acide)

Marquage de neurone par l'intermédiaire de Image J. Marquage du périmètre externe et du noyau permettant de calculer l'intensité du marquage cytosolique. La neurone a été traité pendant 30 minutes par prucalopride (10uM, 37°C), suivi d'un lavage acide (acide acétique 200mM) éliminant tout anticorps de surface n'ayant pas été internalisé.

La figure suivante représente une quantification neuronale en suivant le concept de culture neuronale sans lavage acide [45]. Le processus à suivre pour marquer les neurones de cette façon consiste d'abord à augmenter la luminosité et contraste de l'image afin de bien distinguer le marquage du «background». Le tracé externe et le tracé interne délimitent respectivement la limite externe et la limite interne du noyau du neurone. Le noyau est aussi marqué de la même façon que précédemment. La différence entre le marquage interne et celui du noyau donne l'intensité de marquage cytosolique.

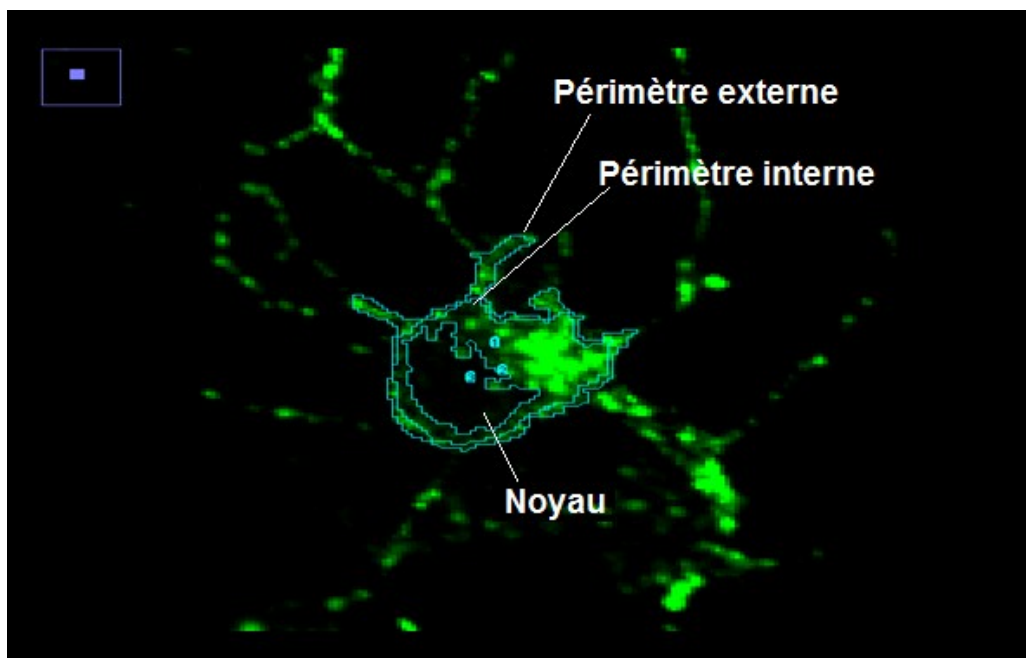


Figure 11. Marquage cytosolique d'un neurone (lavage non acide)

Marquage de neurone par l'intermédiaire de Image J. Marquage du périmètre externe, périmètre interne et du noyau permettant de calculer l'intensité du marquage cytosolique. Le neurone a été traité pendant 30 minutes par 5-HT (10uM, 37°C), suivi d'un lavage non acide (PBS/BSA 1%).

8. Signalisation BRET2- EPAC

Les transfectants de façon stable de cellules HEK293 exprimant le récepteur 5-HT_{4b} sont ensemencés (DMEM + 10% FBS) et laissés en culture dans des pétris de 10cm pendant 24h afin d'obtenir une confluence (25-40%). Les cellules sont ensuite transfectées avec le biosenseur GFP10-Epac-RlucII BRET²-cAMP alors que les cellules contrôles sont transfectées seulement avec RLucII [46]. Les cellules sont ensuite transférées dans des pétris de 3cm puis incubées pendant 24h (DMEM + 10% FBS) afin d'atteindre une confluence d'environ 100%. Au moins 16 heures avant l'expérience, le milieu a été retiré des pétris et remplacé par du DMEM afin de permettre une période de culture en absence de traces de 5-HT qui pourraient être présentes dans le FBS. Le jour de l'expérience, le DMEM est retiré et remplacé par du DMEM frais pour ensuite exposer les cellules aux différentes concentrations de drogue (10^{-5} à 10^{-12} M). L'acide ascorbique (10mM) a été ajoutée afin de protéger la 5-HT ou le RS67333 contre l'oxydation. On fait de même pour ML10302, Zacopride et Prucalopride puis les cellules sont ensuite incubées dans une solution DMEM contenant 750uM d'isobutylmethylxanthine (IBMX) (30 mins, 37°C). Suite au traitement, les cellules vivantes et intactes sont lavés une fois avec du PBS puis sont décollés et resuspendues dans 400uL de Tyrode 1X. Suite au dosage des protéines, elles sont transférées sur une plaque de 96 puits dans laquelle nous ajoutons 10uL/puits d'une solution de DBC (Deepblue coelentérazine, concentration finale de 5uM). Attendre précisément 5 minutes puis procéder à la lecture des plaques dans le lecteur Envision. L'appareil permet l'intégration séquentielle des signaux détectés par RLucII et par GFP10. La mesure BRET2 entre RLuc et GFP10 a été obtenue par l'intégration séquentielle des signaux détectés entre 365-435 nm (luciférase) et 505 à 525 nm (GFP10). Le signal BRET a été calculé comme le rapport de la lumière émise par l'accepteur (GFP10) sur la lumière émise par les donneurs (RlucII). Ces valeurs sont ensuite corrigées pour éliminer l'auto-fluorescence émise par RLucII.

Pour s'y faire, le signal obtenu par RLucII seul est soustrait du «ratioBRET» et permet d'obtenir le «NetBRET». Les données montrées sur graphique sont des «DeltaBRET» qui s'obtiennent en soustrayant le signal obtenu par les cellules non traitées du «NetBRET».

9. Construction du biosenseur EPAC

Le biosenseur GFP10-Epac-RlucII Bret2-cAMP a été construit en trois étapes tel que décrit par Hamdan et al. [47]. Brièvement, une variante de la protéine fluorescente verte (GFP10), le «linker» GSAGT-(Acc65I/HindIII)-KLPAT, et RlucII ont été insérés dans pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen). Une partie de la protéine Epac1 humaine (résidus 144-881) a ensuite été amplifiée par PCR, digérée par HindIII-Acc65I, et insérée en utilisant les mêmes sites de restriction entre les GFP10-GSAGT et KLPAT-RlucII dans pcDNA3.1/Zeo. Finalement, les substitutions T781A et F782A ont été introduites par PCR afin de retirer le site de liaison de Rap1 sur Epac1. Le vecteur d'expression YFP-Gβ1 a été obtenu à partir GFP10-Gβ1 [48] en remplaçant GFP10 avec la séquence codante du eYFP (Pires-EYFP; Clontech, Mountain View, CA). Toutes les constructions générées ont été confirmées par séquençage. [46]

10. Analyse de données et statistiques

Les données provenant des essais ELISA et BRET2 représentent une moyenne d'expériences indépendantes dont chacune a été réalisée en triplicate. L'ajustement des courbes ainsi que les analyses statistiques ont été effectués à partir du logiciel Graph Pad Prism version 4 (San Diego, États-Unis). La signification statistique des différences entre les groupes a été calculée par des analyses ANOVA à deux facteurs tel que détaillé dans la section résultats pour chacune des comparaisons.

Résultats

1. Modulation de la production d'AMPc par le récepteur 5-HT_{4b}

Il est connu que les récepteurs 5-HT₄ sont couplés positivement aux protéines G et leur activation stimule la voie de l'adénylate cyclase et de l'AMPc intracellulaire. Dans les neurones, l'activation de ces récepteurs induit l'accumulation de l'AMPc, activant par la suite la protéine kinase A [24]. Nous avons donc évalué la capacité des différents agonistes à produire ce signal relié non seulement à la physiopathologie de la dépression, mais au mécanisme d'action des antidépresseurs. Pour ce faire, nous avons utilisé l'outil EPAC et la méthode BRET qui ont été discuté dans une section précédente. La capacité de différents ligands connus à moduler la production d'AMPc des récepteur sérotoninergiques de type 4 a été évaluée chez les cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur 5-HT_{4b} (figure 12, p.39). On a remarqué que chacun des agonistes utilisé entraîne, suite à l'activation du récepteur, une hausse de la production d'AMPc en fonction de sa concentration. En effet, le prucalopride est l'agoniste le plus efficace vis-à-vis la production d'AMPc (Effet max : $166,9 \pm 12,7$). Le Zacopride ($114,6 \pm 11,0$), 5-HT ($111,5 \pm 7,8$) et ML10302 ($112,2 \pm 10,3$) possèdent une efficacité intermédiaire similaire. Au contraire, le RS67333 possède la plus faible efficacité ($28,79 \pm 8,3$), soit en moyenne quatre fois moins efficace que l'ensemble des autres agonistes. L'EC₅₀ du prucalopride est comparable avec celle du ML10302 avec une valeur respective de 0,2nM et 0,05nM. Malgré leur efficacité similaire, ces agonistes possèdent des EC₅₀ variables, soit 4.6nM pour 5-HT, 13,7nM pour Zacopride et 0,05nM pour ML. Sur la figure 12 (p.39) est représentée la production d'AMPc des différents agonistes en fonction de leur concentration. Puisque le nombre de sujets n'étaient pas constant entre les groupes, nous avons choisi un test statistique ANOVA (à deux facteurs (ligands x [] ; $n \geq 5$) à mesure non répétée. La première analyse a démontré qu'il y a un effet du ligand ($p = 0,0004$), un effet de la concentration ($p < 0,0001$) ainsi qu'une interaction entre ces deux facteurs ($p < 0,0001$).

La présence de cette dernière nous a permis de pousser l'analyse afin de comparer les différents ligands entre eux avec analyse post hoc utilisant la correction Bonferroni. Tout d'abord, nous avons comparé Pru vs Zaco et avons vu que la différence entre les deux est significative ($p = 0,0208$). Nous avons ensuite comparé ML vs 5-HT ($p = 0,0290$) et 5-HT vs Zaco ($p = 0,5233$) indiquant qu'il y a une différence significative entre ML et 5-HT, mais pas entre 5-HT et Zaco. Finalement, nous trouvons une différence significative lors de la comparaison entre Zaco et RS ($p = 0,0007$). Suite à ces comparaisons, nous avons établi l'ordre d'efficacité des différents ligands suivant :

Prucalopride > Zacopride = ML10302 = 5-HT > RS67333

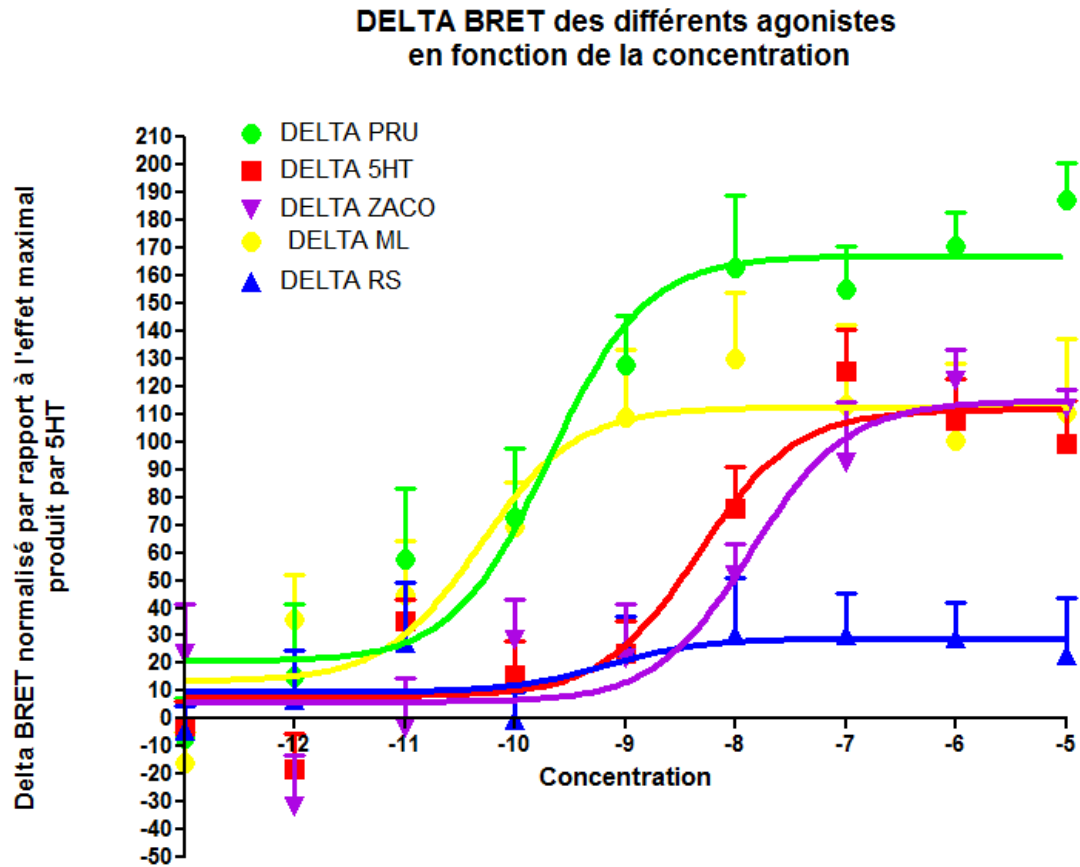


Figure 12. Delta BRET des différents agonistes en fonction de leur concentration

Les cellules HEK293, transfectées de façon stable avec le récepteur 5-HT_{4b}, ont été utilisées dans les essais d'accumulation d'AMPC afin de générer les courbes doses réponses pour chacun des agonistes. Les résultats ont été normalisés afin que l'effet du ligand endogène corresponde à 100% de la production d'AMPC et l'effet des autres agonistes y soit comparé. Chacune des courbes dose-réponse représente une moyenne d'au moins 5 expériences. Les comparaisons statistiques des résultats ont été établies en utilisant ANOVA à deux facteurs (ligand x []). L'analyse est détaillée dans le corps du texte.

Signalisation chez les cellules HEK (EPAC-BRET)		
Agonistes	EC 50	Effet max
Prucalopride	0.2 nM	166.9 ± 12.7
ML10302	0.05 nM	112.2 ± 10.3
Zacopride	13.7 nM	114.6 ± 11.0
5-HT	4.6 nM	111.5 ± 7.8
RS67333	0.64 nM	28.79 ± 8.3

Tableau II. Effet maximal et EC50 des agonistes utilisés dans la mesure de signalisation des récepteurs 5-HT_{4b} chez les cellules HEK

2. Régulation de la signalisation du récepteur 5-HT_{4b}

a. Internalisation chez les cellules HEK

Afin de vérifier l'ordre d'efficacité qui a été déterminé précédemment, nous avons décidé d'effectuer une seconde mesure fonctionnelle afin d'établir s'il y a différentes conformations actives des récepteurs susceptibles d'engendrer des effets antidépresseurs. Pour ce faire, nous avons choisi l'internalisation, qui est partie intégrante du mécanisme de régulation qui est déclenchée par l'activation du récepteur par différents agonistes. Elle constitue en fait l'un des pas initiaux du processus de régulation des signaux générés par les RCPGs. Nous allons alors comparer la capacité de différents ligands connus à stimuler l'internalisation du récepteur 5-HT_{4b}. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) qui nous a permis de déterminer comment la stimulation du récepteur change sa présence à la membrane.

Les résultats indiquent que les différents agonistes induisent une internalisation des récepteurs et que celle-ci est croissante dans le temps, excepté pour RS67333 (figure 13, p.42). L'exposition à la 5-HT produit l'internalisation la plus efficace (Effet max : $94,89 \pm 5,88$ % des récepteurs membranaires ont été internalisés) au contraire du RS (Effet max : 20.0) dont l'effet est minimal. L'effet maximal du Zacopride ($70,52 \pm 7,99\%$) est légèrement inférieur à celui de 5-HT et pour sa part, le Prucalopride possède une efficacité intermédiaire ($52,37 \pm 4,19$ %). Finalement, le ML possède une efficacité ($28,28 \pm 5,27\%$) légèrement supérieure à celle de RS67333.

Le temps de demi-vie $t_{1/2}$ d'internalisation, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que la moitié des récepteurs soient internalisés est d'environ 25 minutes pour le 5-HT. On note que le temps de $\frac{1}{2}$ vie d'internalisation est semblable pour 5-HT, Zacopride (21,9 mins) et Prucalopride (22,10 mins), indiquant que la vitesse d'internalisation n'est pas nécessairement différente malgré une internalisation maximale différente. Finalement, le ML a un temps de $\frac{1}{2}$ vie d'internalisation d'environ 13 minutes (Tableau III, p.43). L'analyse statistique ANOVA à deux facteurs (ligands x temps, $n \geq 5$) indique qu'il y a un effet du ligand ($p < 0,0001$), un effet du temps ($p < 0,0001$) ainsi qu'une interaction significative entre ceux deux facteurs ($p < 0,0001$). La présence de cette dernière nous a permis de pousser l'analyse afin de comparer les différents ligands entre eux avec analyse post hoc utilisant la correction Bonferroni et d'établir l'ordre d'efficacité suivant :

5-HT > Zacopride \geq Prucalopride > ML10302 > RS67333

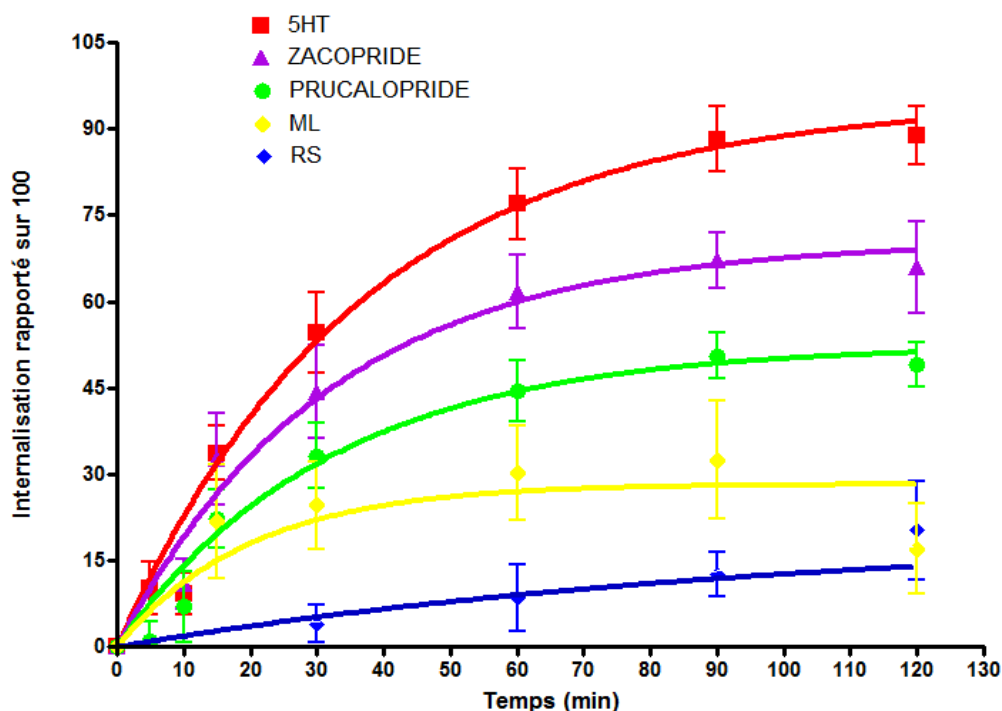


Figure 13. Cinétique d'internalisation du récepteur 5-HT_{4b} dans les cellules HEK suite à stimulation par différents agonistes

Les cellules HEK293, transfectées de façon stable avec le récepteur 5-HT_{4b} ont été utilisées dans les essais ELISA afin de générer une courbe d'internalisation en fonction du temps pour ces cellules exposés à différents agonistes (10uM). Les résultats ont été normalisés afin que le maximum d'efficacité d'internalisation produite par la 5-HT corresponde à 100%. Chacune des courbes représente une moyenne d'au moins 5 expériences. Un test ANOVA (à deux facteurs) suivi d'une correction Bonferroni relève que l'effet d'internalisation induit par chacun des ligands est significativement différent les uns par rapport aux autres. Les détails de ces comparaisons sont discutés dans le corps du texte.

Internalisation chez les cellules HEK293 (Technique ELISA)		
Agonistes	Temps ½ vie d'internalisation	Effet max
5-HT	25.26	94.89 ± 5.9
Zacopride	21.90	70.52 ± 7.9
Prucalopride	22.10	52.37 ± 4.2
ML10302	13.66	28.28 ± 5.3
RS67333	---	20.00

Tableau III. Temps ½ vie et efficacité des agonistes utilisés dans la mesure d'internalisation du récepteur 5-HT_{4b} chez les cellules HEK

b. Internalisation dans les neurones

Sachant que les effets antidépresseurs n'ont pas lieu dans les cellules HEK, mais plutôt dans les neurones, nous avons mesuré l'internalisation des mêmes agonistes dans des neurones corticaux. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique d'immunofluorescence qui a été discutée précédemment. Bref, nous avons effectué l'expérience avec deux méthodes distinctes, la première inclut un lavage acide qui permet de retirer tout anticorps de surface n'ayant pas été internalisé. Le temps de traitement en présence de l'agoniste a été fixé à 30 minutes pour chacun. En regardant le basal, on trouve un certain niveau de marquage intracellulaire impliquant probablement l'internalisation constitutive en l'absence de ligand. L'activation des récepteurs par RS67333 et ML10302 permet une internalisation plus forte que celle du basal. Les agonistes 5-HT, Zaco et Pru semblent favoriser l'internalisation davantage que les deux autres agonistes. (Figure 14, p.44)

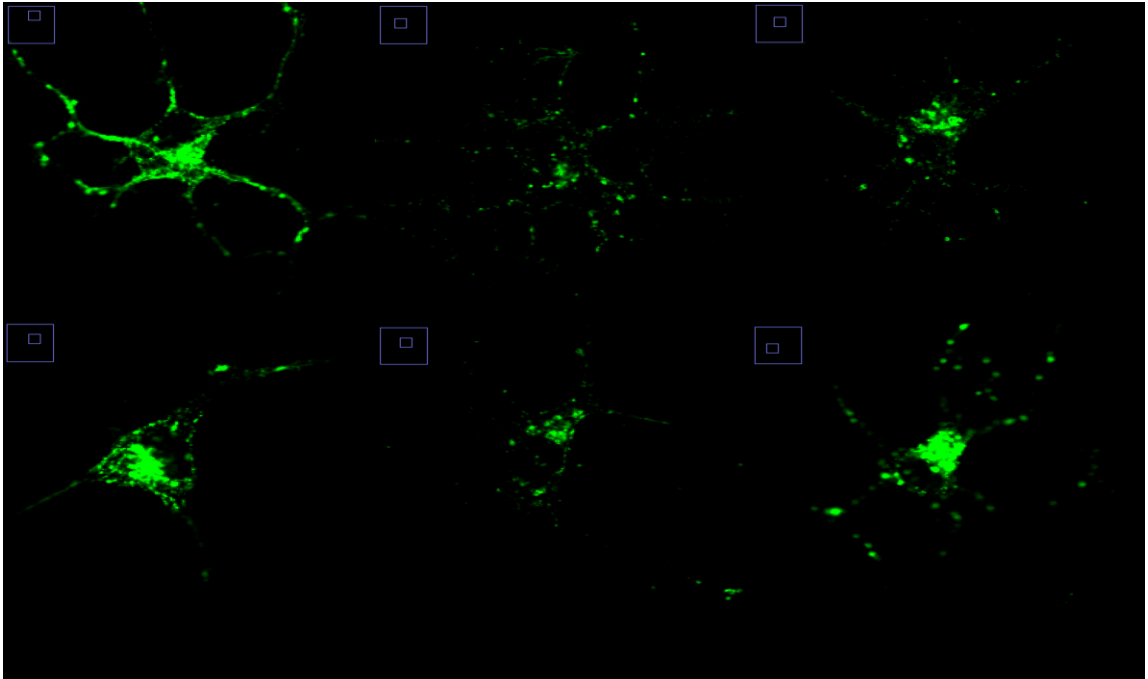


Figure 14. Internalisation des récepteurs 5-HT_{4b} suite à stimulation par différents agonistes

La culture neuronale a été effectuée comme décrit dans la section expérimentale. Les récepteurs de surface ont été marqués « in vivo » avec un anticorps primaire pour ensuite être exposé pendant 30 mins aux agonistes indiqués (10uM). Suite au traitement, les cellules ont été soumises à un lavage acide et traitées pour l'étiquetage intracellulaire comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes » [49]. Les images d'immunofluorescence sont obtenues par le microscope Olympus équipé d'un système confocal DSU («disk scanning unit»). La quantification a été produite par Image J qui fournit des données à unités arbitraires permettant de comparer l'effet d'internalisation d'un agoniste à l'autre.

Afin d'avoir une mesure concrète du niveau d'internalisation produite par les divers agonistes, nous avons quantifié les neurones en marquant leur cytoplasme. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel Image J pour délimiter un périmètre qui renferme l'immunofluorescence tel que décrit dans la figure 10 et la figure 11 (p.33-34) et les résultats de quantification nous permettent d'établir s'il y a des différences d'internalisation entre les drogues. Ce que nous comparons est donc l'intensité de marquage moyen du cytoplasme pour chacun des neurones et chacun des agonistes avec un temps de traitement fixé à 30 minutes.

Nous observons que le marquage moyen du basal est faible comparativement à l'ensemble des autres agonistes, mais la différence entre eux est minimale. La figure 15 montre l'internalisation suite à 30 minutes d'incubation de chacun des agonistes. Ces valeurs correspondent à la moyenne d'au moins 5 neurones par drogues qui ont été obtenus dans une même expérience. Ainsi, la variabilité représentée par l'erreur type moyen apparaissant dans la figure correspond à la variabilité intra expérimentale. Afin de pouvoir faire des comparaisons statistiquement valables, nous devrons répéter le même type d'expérience un minimum de 3 fois. À ce moment, nous pourrions procéder à une analyse ANOVA à 1 facteur (drogues) afin de comparer les drogues entre eux et avec le basal.

**Marquage moyen du cytoplasme en utilisant différents agonistes
(30 mins)**

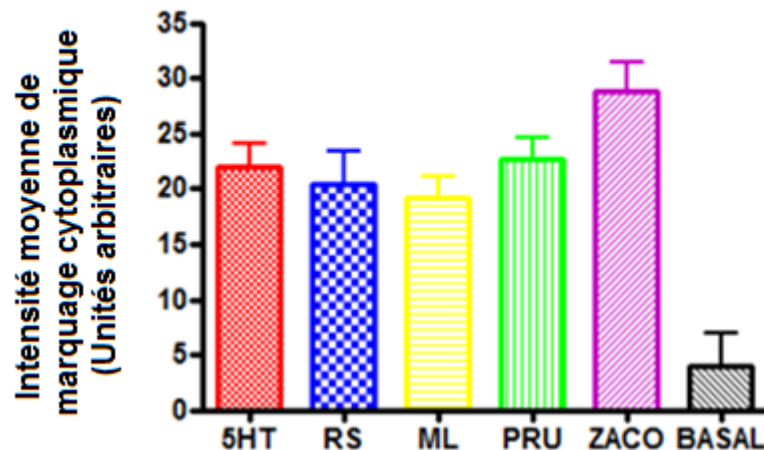


Figure 15. Intensité moyen de marquage du cytoplasme pour les différents agonistes (lavage acide)

La culture neuronale et le marquage cellulaire ont été effectués comme décrit dans la figure 14 (p.44). Les récepteurs de surface ont été marqués « in vivo » avec un anticorps primaire pour ensuite être exposé pendant 30 mins aux agonistes indiqués (10uM, 37°C). Suite au traitement, les cellules ont été soumises à un lavage acide et traitées pour l'étiquetage intracellulaire comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes » [49]. Les résultats d'une seule expérience sont montrés dans cette figure et correspond à la moyenne \pm erreur type moyen du marquage intracellulaire observé pour 5-10 neurones par drogues. Il s'agit alors d'une variation intra expérimentale.

Les mesures précédentes ont été obtenues selon le concept où le marquage permet exclusivement de voir les récepteurs qui ont été internalisés car les anticorps de surface ont été lavés par un lavage acide. Ainsi, il est difficile de tracer de façon claire le contour externe des neurones. Il devient donc difficile de quantifier le cytoplasme de façon précise lorsqu'on ne connaît pas ses limites exactes. Nous avons ainsi essayé une seconde méthode publiée par Kieffer et Scherrer 2006 [45] qui nous permet de délimiter ce périmètre externe du neurone de façon précise. Le concept de cette deuxième méthode est similaire à la précédente, omis le lavage acide qui a été remplacé par un lavage au PBS. Le bénéfice de cette méthode par rapport à la précédente est que la délimitation de la surface externe du neurone est plus facile à tracer puisque sans le lavage acide, les anticorps de surface produiront une fluorescence qui permet de tracer le contour externe du neurone de façon plus précise. On remarque sur les images de la figure 16 (p.47) que les délimitations externes des cellules sont beaucoup plus précises que les images obtenues avec la première méthode utilisant le lavage acide. On remarque que même dans la figure présentant le neurone n'ayant pas été traité par un ligand (basal), il y a une internalisation constitutive. Le RS et ML induisent une internalisation un peu plus forte que l'internalisation constitutive alors que les autres agonistes induisent significativement davantage (fig. 17, p.48). Maintenant, grâce à une bonne délimitation cytosolique, la quantification est plus représentative de ce qu'on observe dans les figures. Ainsi, la quantification cytoplasmique calculée par Image J est plus précise et davantage représentative. La quantification nous démontre que le Zacopride induit la plus forte internalisation, suivi de 5-HT et de Prucalopride. Les agonistes RS67333 et ML10302 semblent avoir un effet similaire et plus faible que les autres. Bref, les résultats révèlent une internalisation différentielle dont l'ordre d'efficacité des agonistes ressemble à celle observée chez les cellules HEK (fig. 13, p.42).

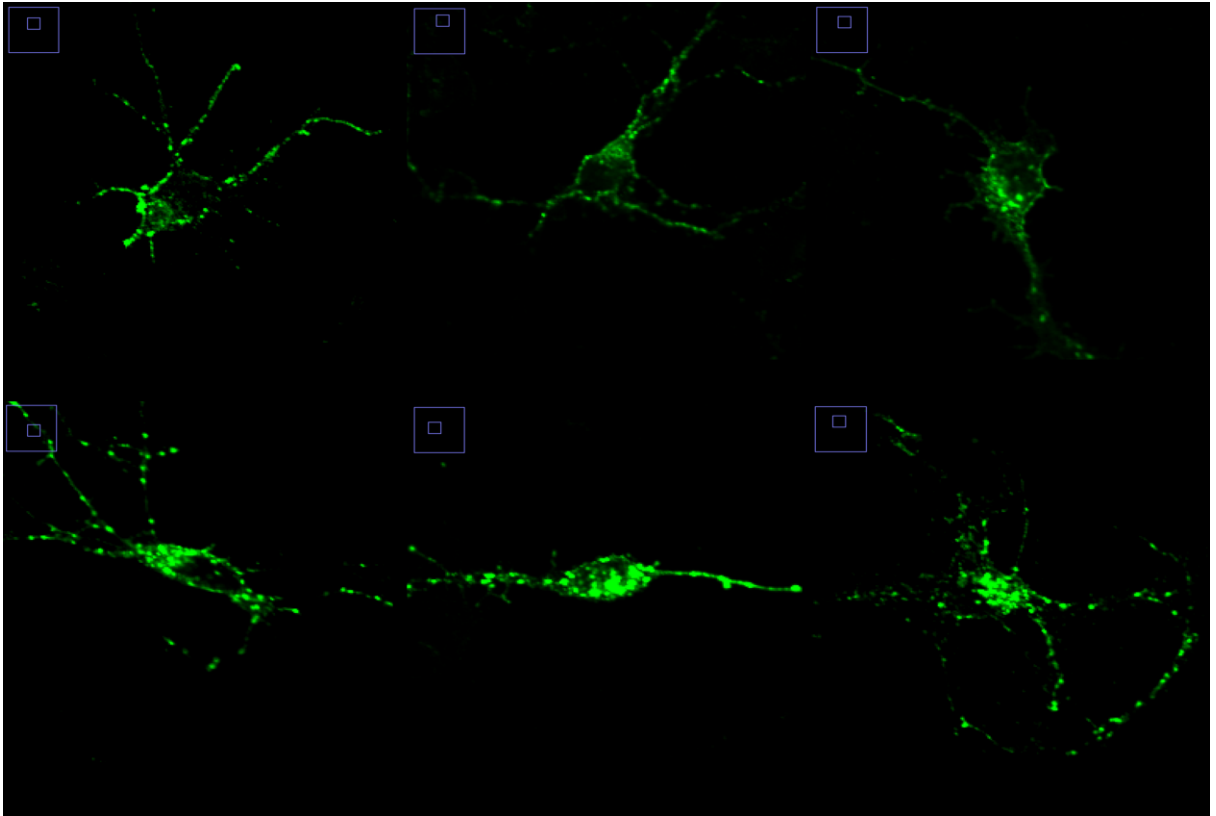


Figure 16. Internalisation des récepteurs 5-HT_{4b} suite à stimulation par différents agonistes

La culture neuronale et le marquage intracellulaire a été effectuée comme décrit dans la figure 14. Les récepteurs de surface ont été marqués « in vivo » avec un anticorps primaire pour ensuite être exposé pendant 30 mins aux agonistes indiqués (10uM). Suite au traitement, les cellules ont été soumises à un lavage au PBS/BSA 1% au lieu d'un lavage acide.

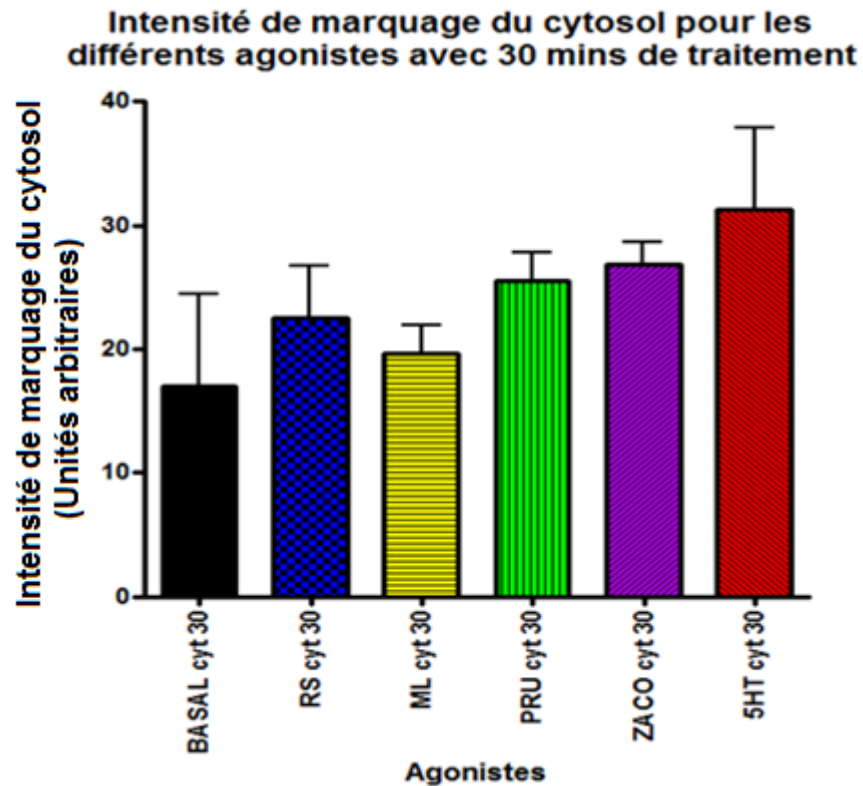


Figure 17. Intensité moyenne de marquage du cytoplasme pour les différents agonistes (sans lavage acide)

La culture neuronale et le marquage cellulaire ont été effectués comme décrit dans la figure 14 (p.44). Les récepteurs de surface ont été marqués « in vivo » avec un anticorps primaire pour ensuite être exposé pendant 30 mins aux agonistes indiqués (10uM, 37°C). Suite au traitement, les cellules ont été soumises à un lavage au PBS/BSA 1% au lieu d'un lavage acide et traitées pour l'étiquetage intracellulaire comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes » [49]. Les résultats présentés sur ce graphique proviennent d'une seule manipulation et représente une moyenne \pm erreur type intra expérimental de l'intensité de marquage de 5-10 neurones par drogues.

Comme la quantification relèvent un ordre d'efficacité des agonistes qui ressemble à celle observée chez les cellules HEK, nous avons ajouté la variable temps à nos mesures (15, 30 et 60 mins) afin de vérifier si les ligands possèdent un même ordre d'efficacité d'internalisation dans le temps chez les neurones comme chez les cellules HEK.

Pour chacun des temps, le basal nous permet d'identifier qu'il y a une internalisation constitutive. On remarque que pour chacune des expositions aux agonistes pendant 15 minutes (fig.18, p.50), le marquage intracellulaire est moins important que pendant 30 et 60 minutes (fig.19, p.51). On remarque d'ailleurs que l'internalisation constitutive est dépendante du temps et avons confirmé par quantification puisque le marquage intracellulaire du basal à 15 minutes est moins prononcé qu'à 30 minutes, et ce dernier moins prononcé qu'à 60 minutes. Ces résultats nous ont montré que chacun des agonistes est en mesure d'induire une internalisation des récepteurs dans les neurones et que cette dernière est dépendante du temps (fig.20, p.52). Afin de mieux comparer les effets des drogues et du temps, nous avons exprimé nos résultats sous la forme d'un graphique exprimant l'intensité de marquage du cytosol en fonction du temps, et ce pour chacun des agonistes. Pour s'y faire, nous avons corrigé les résultats d'internalisation agoniste-dépendant en les exprimant en pourcentage par rapport au basal correspondant (fig.21, p.54). Suite à interprétation des données recueillies à partir de cette, l'ordre d'efficacité d'internalisation des différents ligands est le suivant :

5-HT > Zacopride > Prucalopride \geq RS67333 \geq ML10302

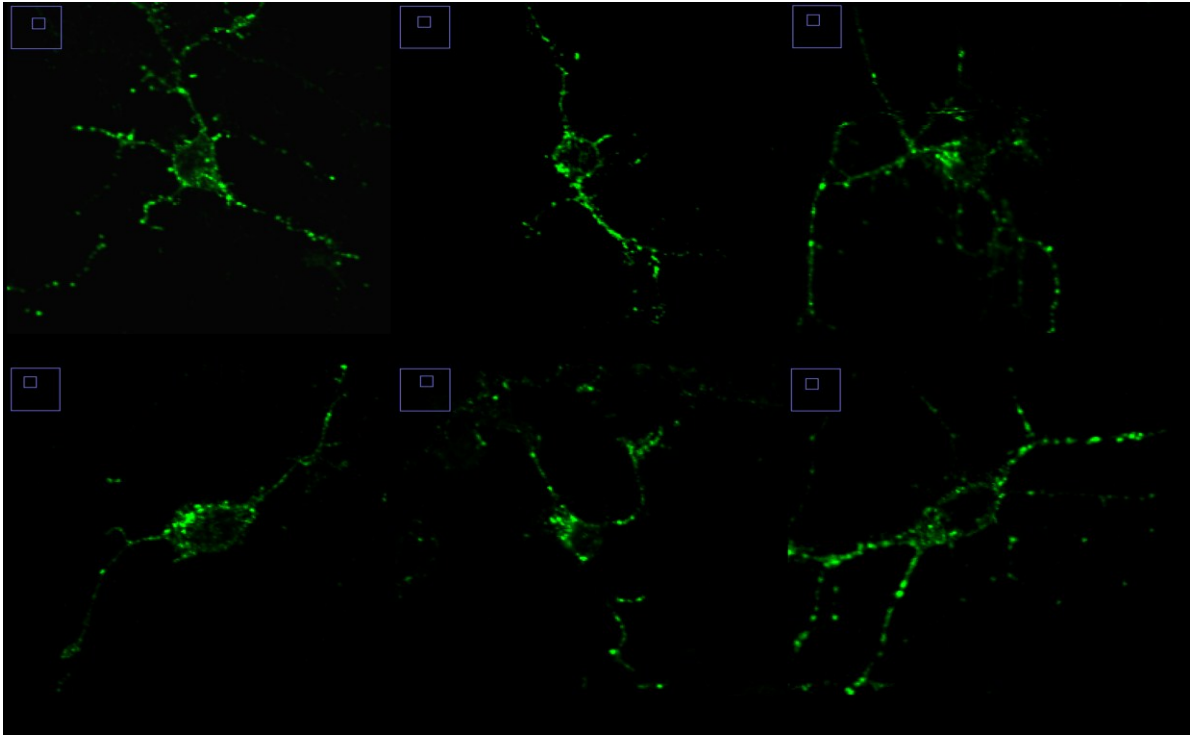


Figure 18. Internalisation des récepteurs 5-HT_{4b} suite à stimulation par différents agonistes pendant 15 minutes

La culture neuronale et le marquage intracellulaire a été effectuée comme décrit dans la figure 14. Les récepteurs de surface ont été marqués « in vivo » avec un anticorps primaire pour ensuite être exposé pendant 15 mins aux agonistes indiqués (10uM). Suite au traitement, les cellules ont été soumises à un lavage au PBS/BSA 1%.

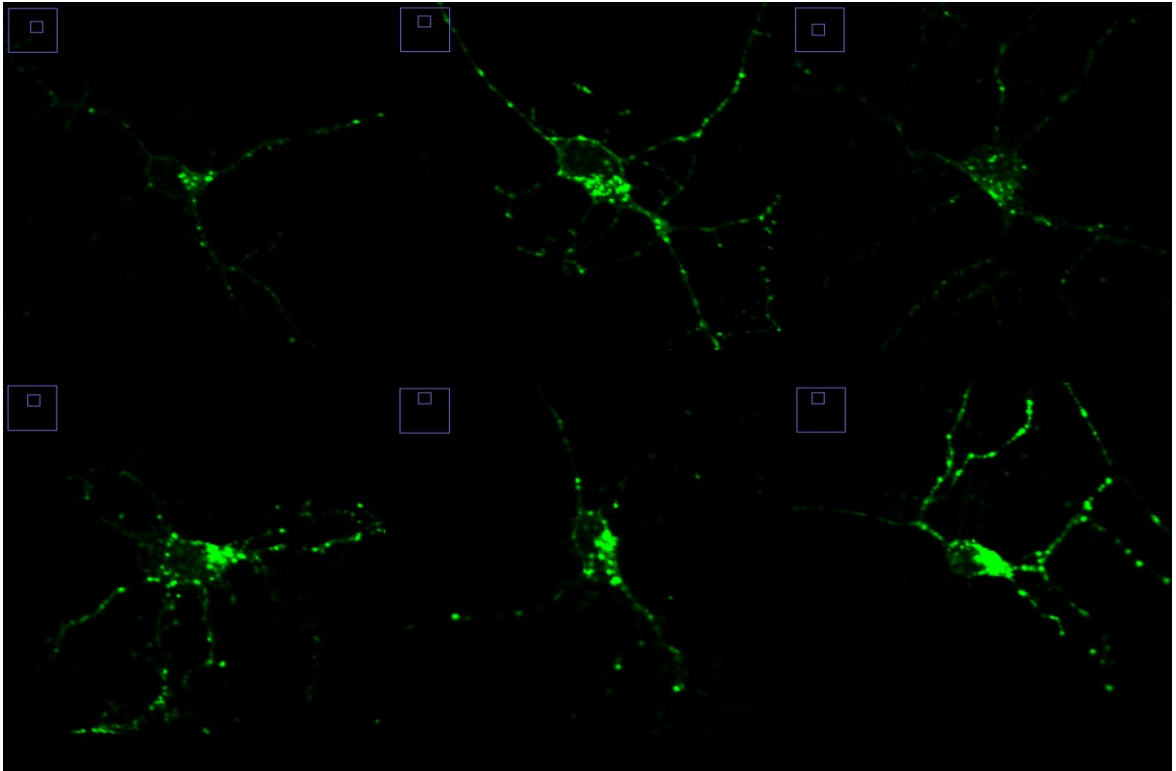


Figure 19. Internalisation des récepteurs 5-HT_{4b} suite à stimulation par différents agonistes

La culture neuronale et le marquage intracellulaire a été effectuée comme décrit dans la figure 14. Les récepteurs de surface ont été marqués « in vivo » avec un anticorps primaire pour ensuite être exposé pendant 60 mins aux agonistes indiqués (10uM). Suite au traitement, les cellules ont été soumises à un lavage au PBS/BSA 1%.

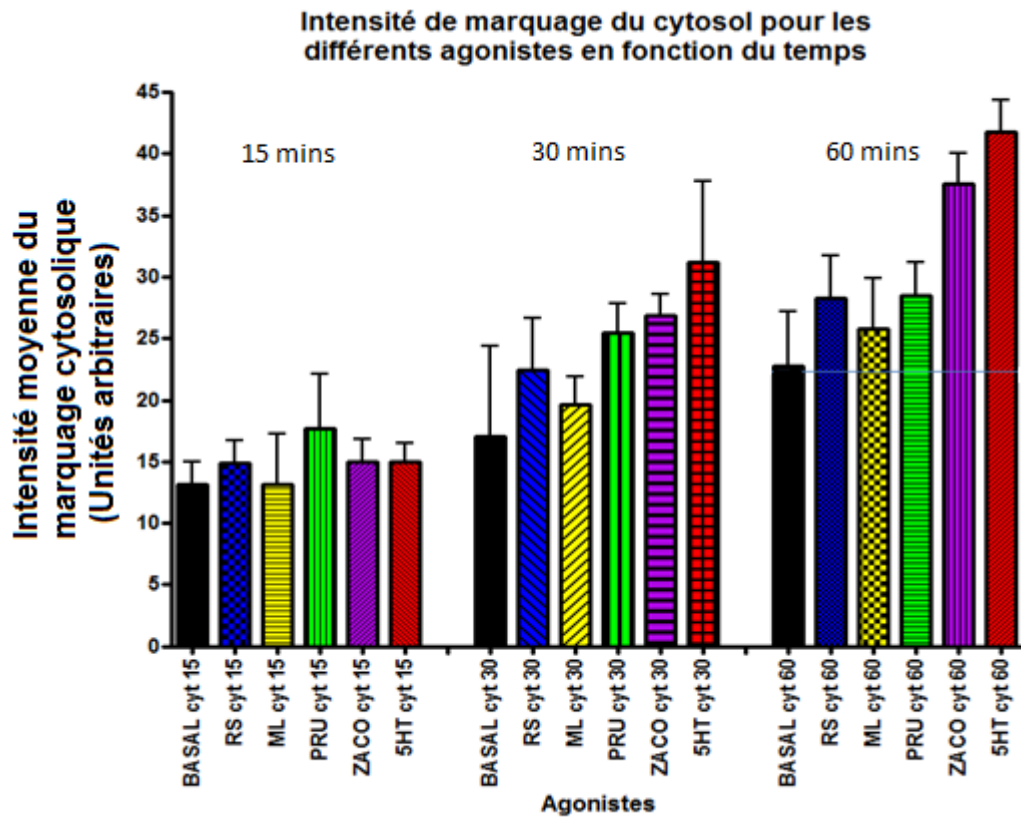


Figure 20. Intensité moyenne de marquage du cytoplasme pour différents agonistes (sans lavage acide, 15, 30 et 60 minutes)

La culture neuronale et le marquage cellulaire a été effectuée comme décrit dans la figure 14. Les neurones, transfectés avec le récepteur 5-HT_{4b}-HA ont étéensemencés sur des lamelles [45]. Le jour de l'expérience, les cellules ont été exposées aux différents agonistes (10 μ M; 37°C) pendant 15, 30 et 60 minutes. Suite au traitement, les cellules ont été fixées, perméabilisées et soumises à un lavage au PBS/BSA pour enfin être traitées pour l'étiquetage intracellulaire comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes » [49]. Les résultats d'une seule expérience sont identifiés dans cette figure et correspondent à la moyenne \pm erreur type moyen du marquage intracellulaire observé pour 5-10 neurones par drogues.

En rapportant le marquage cytosolique des différents neurones en fonction du temps nous avons obtenu une courbe (figure 21, p.54) permettant de comparer l'efficacité des différents agonistes à induire l'internalisation des récepteurs dans les neurones. Nos résultats indiquent un même ordre d'efficacité des différents agonistes à induire l'internalisation que dans les cellules HEK. Cette expérience a été effectuée une seule fois, ainsi, les temps de $\frac{1}{2}$ vie étant trop variables, n'ont pas été calculés. Le maximum d'internalisation a été calculé en traçant une courbe moyenne liant le maximum d'internalisation à 15, 30 et 60 minutes. Les valeurs calculées ont été rapporté sur le tableau IV (p.55) et suite à interprétation de ces données, l'ordre d'efficacité d'internalisation des différents ligands dans les neurones est le suivant :

5-HT > Zacopride > Prucalopride \geq RS67333 \geq ML10302

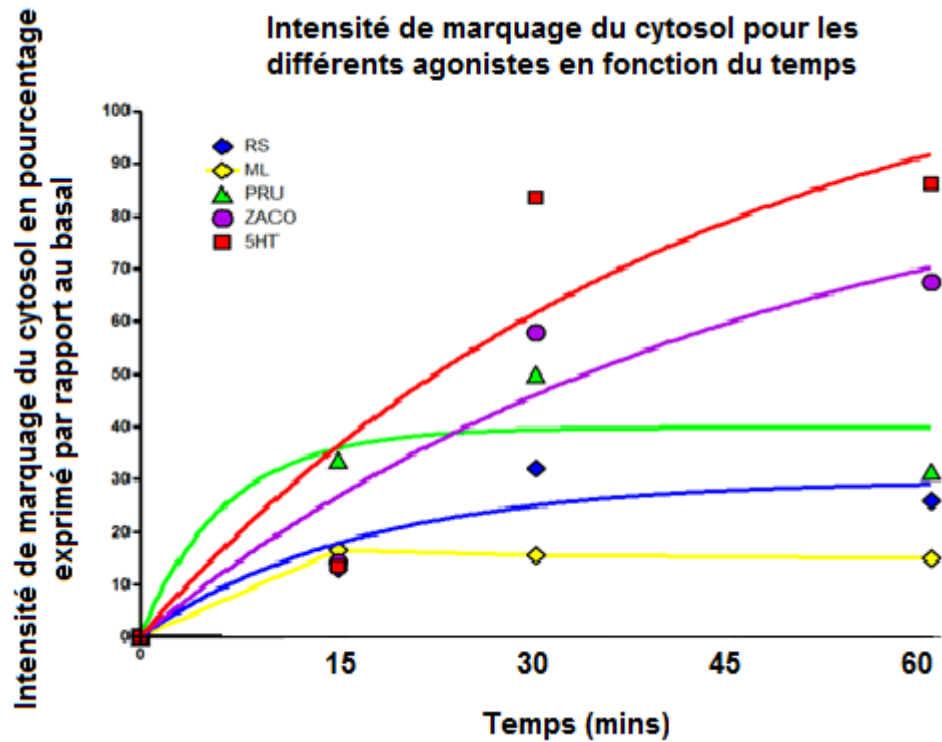


Figure 21. Intensité de marquage cytosolique exprimé en fonction du temps

Représentation graphique de l'intensité de marquage du cytosol en fonction du temps. Les résultats ont été normalisés par rapport au basal dont l'intensité de marquage est presque nulle. L'intensité du marquage est exprimée pour chacune des drogues et correspond à une moyenne \pm erreur type moyen de 5-10 neurones par drogues. Il s'agit ici d'une variation est intra expérimentale.

Agonistes	Effet max
5-HT	120.7
Zacopride	97.16
Prucalopride	39.79
ML10302	ND
RS67333	29.79

Tableau IV. Efficacité des agonistes utilisés dans la mesure d'internalisation du récepteur 5-HT_{4b} chez les neurones. Les valeurs correspondent à l'asymptote maximale de la courbe cinétique d'internalisation.

Discussion

Dans l'ensemble des récepteurs sérotoninergiques existant, nous nous sommes particulièrement intéressés aux récepteurs 5-HT₄, lesquels possèdent l'un des plus larges gènes des récepteurs couplés aux protéines G, avec 700kb. Les récepteurs 5-HT₄ étant largement distribués dans le système nerveux central et périphérique, ont été reconnus comme cibles putatives dans l'action des antidépresseurs. Plus particulièrement, parmi les 9 isoformes du récepteur 5-HT₄ (possédant tous une séquence primaire identique, mais une extrémité C-terminale différente à partir de la Leu358), nous nous sommes penchés sur l'isoforme b puisqu'il semble être le plus fortement exprimé dans le système limbique, le quel est affecté au cours d'un épisode dépressif. Nous avons montré que cet isoforme détient une signalisation et une régulation différente dépendant du ligand activateur.

Les résultats concernant les propriétés de signalisation des récepteurs 5-HT_{4b} suite à l'activation par divers agonistes nous indiquent que ces derniers modulent distinctivement la production d'AMPC. Les résultats nous ont clairement permis de déterminer que les agonistes possèdent une efficacité différente les uns par rapport aux autres. Le biosenseur EPAC utilisé s'est avéré un outil simple et efficace pour mesurer la production d'AMPC. En le joignant à la méthode BRET2, nous avons tracé une courbe dose réponse et avons observé que le prucalopride possède la plus haute efficacité et puissance vis-à-vis l'augmentation de production d'AMPC. Les effets antidépresseurs de l'agoniste RS67333 ont déjà été démontré dans un modèle animal [16]. Il est donc connu que cette drogue est en mesure de fournir un effet antidépresseur rapide et à long terme comme discuté précédemment. Malgré cela, lors de la comparaison de l'induction de la production d'AMPC, il était le moins efficace. Suite à l'activation d'un RCPG par un agoniste, non seulement les voies de signalisation sont déclenchées, mais aussi des voies de régulation qui permettent de contrôler la durée d'activation des récepteurs de façon à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur sur la cellule. [16]

La désensibilisation des récepteurs se définit comme étant une réduction de la capacité des récepteurs à transmettre un signal et constituerait une étape cruciale dans la mise en place du phénomène de tolérance rendant alors les cellules cibles moins sensibles à l'action des agonistes 5-HT₄ possédants un potentiel d'action antidépresseur. Il est donc important d'étudier la désensibilisation car considérant que ces drogues doivent être administrées de façon chronique à un patient dépressif, il ne faudrait pas que l'antidépresseur induise une tolérance chez ce même patient.

Les processus moléculaires de la désensibilisation font intervenir de nombreuses protéines et différents mécanismes comme la phosphorylation, l'internalisation et le recyclage des récepteurs. L'internalisation et la distribution post-endocytyque des RCPGs sont déterminées par plusieurs facteurs comme l'activité des kinases capables de phosphoryler les résidus Ser/Thr intracellulaires [27, 50], et par la capacité de la β -arrestine à interagir avec le récepteur [29, 51]. Puisque l'internalisation est déclenchée par l'administration d'antidépresseurs et faisant partie intégrante du mécanisme de régulation cellulaire, nous l'avons sélectionné pour pousser nos recherches.

Les résultats concernant l'internalisation des récepteurs 5-HT_{4b} suite à stimulation par divers ligands dans les cellules HEK293 nous a indiqué que les agonistes testés seraient en mesure d'induire l'internalisation. Les résultats présentés nous montrent cependant que le niveau d'internalisation est spécifique à chaque agoniste. Les différences dans l'ampleur d'internalisation ligand-dépendante de 5-HT et de RS vis-à-vis le récepteur 5-HT_{4b} a été signalé précédemment [43]. Cette observation a été confirmée et étendue dans la présente étude, où nous avons également comparé le niveau d'internalisation induit par Zacopride, Prucalopride et ML10302. Nos résultats obtenus dans les cellules HEK indiquent que l'agoniste le plus efficace par rapport à l'internalisation du récepteur 5-HT_{4b} est le 5-HT alors que le moins efficace s'avère être le RS67333. L'ensemble des autres agonistes testés possèdent une efficacité intermédiaire entre nos deux extrêmes.

En gardant à l'esprit que la spécificité des réponses biologiques d'un agoniste est dépendante de la disponibilité des protéines de signalisation/régulation dans chaque type de cellule, il est difficile d'établir à partir des observations dans des cellules HEK ce qu'une «réponse normale» serait suite à la stimulation des récepteurs sérotoninergiques dans le cerveau. Ainsi, pour affirmer si la distribution subcellulaire observée chez les cellules HEK était préservée dans un système où les récepteurs sérotoninergiques sont exprimés naturellement, l'expérience a été répétée sur des cultures primaires de neurones corticaux transfectées stablement avec le récepteur 5-HT_{4b}. La première chose à considérer est la possibilité d'internalisation constitutive, mais cette idée que la redistribution des récepteurs vers le compartiment intracellulaire serait due à l'endocytose constitutive et non pas à une exposition aux différents agonistes a été étayé par le fait que l'internalisation a également été présente dans des cellules non traitées. La présence de l'internalisation constitutive n'est pas surprenante étant donné la forte activité spontanée des récepteurs 5-HT₄ [52]. Les résultats d'immunofluorescence indiquent ensuite que chacun des agonistes est en mesure d'induire une internalisation dans les neurones de façon spécifique. En observant cette internalisation dans le temps, nous avons remarqué que 5-HT induisait la plus forte internalisation, au contraire de RS qui possède une faible efficacité.

	Ordres d'efficacité
HEK 293	
AMPC Internalisation	Prucalopride > Zacopride = ML10302 = 5-HT > RS67333 5-HT > Zacopride ≥ Prucalopride > ML10302 > RS67333
Neurones	5-HT > Zacopride > Prucalopride ≥ RS67333 ≥ ML10302

Tableau V. Ordres d'efficacité des agonistes selon des différentes expériences réalisées.

Dans l'ensemble des expériences effectuées, autant en régulation qu'en signalisation, le RS constituait l'agoniste le moins efficace vis-à-vis l'induction d'internalisation et la production d'AMPC respectivement. Il est possible que des agonistes comme RS67333, caractérisés en tant qu'«agoniste partiel» des récepteurs 5-HT₄ dans la littérature biochimique [53] et comportementales [54] ne serait pas en mesure d'accumuler autant de récepteurs activés que pourrait le faire le prucalopride ou 5-HT par exemple. Ou est-ce que cette différence est plutôt dû au fait que les agonistes stabiliseraient différentes conformations actives du récepteur 5-HT_{4b}?

Alors que la théorie classique suppose que les récepteurs passent simplement d'un état «inactif» à «actif» suite à la liaison du ligand, des données plus récentes indiquent que les agonistes seraient en mesure d'induire des changements conformationnels des récepteurs [55]. La démonstration a été fournie à l'échelle moléculaire et prouve que les différentes conformations actives d'un récepteur peuvent produire une sélectivité fonctionnelle pour les voies de signalisation [56]. Pour répondre à la masse croissante de preuves pour plusieurs états conformationnels dans des considérations théoriques, différents modèles ont été proposés.

Un de ces modèles propose que chaque agoniste pourrait promouvoir sa propre conformation active du récepteur, conduisant ainsi à un nombre presque illimité de conformations possibles des récepteurs. Un autre modèle suggère qu'il pourrait y avoir un nombre limité de conformations actives dans lequel différents agonistes pourraient induire un changement de conformation [31] [32]. Ainsi, suivant ce principe, il existerait différentes conformation actives du récepteur, quelque unes plus efficace que d'autres à induire des effets antidépresseurs. Autrement dit, la conformation stabilisée par le prucalopride provoquerait une plus forte stimulation de la production d'AMPC alors que la conformation stabilisée par RS67333 ne déclencherait pas le même type de réponse biologique, mais serait beaucoup plus efficace à produire des effets ADs. Encore aujourd'hui, nous ne connaissons pas la vérité à ce propos, mais les études actuelles essaient de mettre le doigt sur le véritable processus.

Une façon de vérifier si les différents ligands stabilisent différentes conformations actives est de comparer leur rang d'efficacité à induire différents types de réponses. C'est pour cette raison que nous avons comparé l'ordre d'efficacité des agonistes dans des expériences de régulation et de signalisation. En internalisation, autant chez les cellules HEK que dans les neurones, nous avons obtenu un ordre d'efficacité commun, mais différent de celui obtenu lors de la mesure du niveau d'AMPC induit par ces agonistes.

L'ordre d'efficacité des agonistes à induire l'internalisation des récepteurs vers le compartiment intracellulaire dans les cellules HEK et dans les neurones a été établi comme suit : (5-HT > Zacopride > Prucalopride \geq RS67333 \geq ML10302) alors qu'en signalisation : (Prucalopride > Zacopride = ML10302 = 5-HT > RS67333). Ainsi, le rang d'efficacité étant différent d'une réponse fonctionnelle à l'autre, nous mène à croire que les agonistes induisent différentes conformations actives du récepteur comme il a déjà été discuté précédemment [56].

Il a déjà bien été établi que les changements conformationnels des RCPGs se produisent dans les domaines transmembranaires III et VI [57]. Ces changements sont censés être transmis dans la troisième boucle intracellulaire qui semble contenir des domaines clés pour le couplage aux protéines G, plus particulièrement au niveau de l'extrémité C-terminale, mais aussi à son extrémité N-terminale [58]. Il est donc connu qu'en stabilisant différentes conformations d'un même récepteur, les agonistes ne produisent pas nécessairement le même déplacement d'hélices et de boucles intracellulaires [59]. Ainsi, dépendamment de l'agoniste activateur, les récepteurs sérotoninergiques exposeraient différents résidus aux protéines G. Ce phénomène discuté précédemment qu'on appelle la sélectivité fonctionnelle semble nous ouvrir les portes vers des perspectives prometteuses. Plus précisément, il consiste à exploiter la capacité des ligands à stabiliser différentes conformations de récepteurs activant des voies distinctes de signalisation. Cette théorie de la sélectivité nous apporte un regard nouveau sur la définition de l'efficacité des molécules.

Ainsi, si une même protéine peut adopter différentes conformations liées à différentes voies de signalisation, une molécule se liant préférentiellement à l'une ou l'autre des conformations possibles activerait préférentiellement une voie de signalisation afin d'engendrer le plus précisément possible l'effet recherché. Bref, en comparant le niveau d'accumulation d'AMPc engendré par les divers agonistes sur le récepteur 5-HT_{4b} (une des principale voie de signalisation), il serait possible d'obtenir des ligands favorisant des voies associées aux effets antidépresseurs au détriment de celles associées aux effets indésirables.

Cette propriété pourrait être exploitée pour produire des effets antidépresseurs de longue durée avec un minimum d'effets secondaires. Le problème est que pour l'instant, nous ne connaissons pas quels sont les signaux qui mènent à un effet antidépresseur.

Une méthode qui nous permettrait de prouver que les différentes conformations de récepteurs mènent à différentes réponses antidépressives serait par l'intermédiaire du biosenseur EPAC1-BRET2 discuté précédemment. Plusieurs récents progrès scientifiques ont emmené vers la création de ce biosenseur EPAC. Cette technique, très prometteuse dans le criblage à haut débit permet de détecter l'efficacité de divers ligands dans la voie de signalisation sérotoninergiques et peut être transposé à d'autres RCPGs. Nous pourrions ainsi étiqueter un marqueur fluorescent sur le C-terminal des récepteurs (GFP par exemple) et sachant que les changements sont censés être transmis dans la troisième boucle intracellulaire, il faudrait étiqueter avec un second marqueur (accepteur) à différents sites au niveau de cette boucle. Soit par exemple au niveau du domaine N-terminale (proche de domaine transmembranaire V), dans le milieu de la boucle ou au niveau C-terminale (proche de domaine transmembranaire VI) [60]. Cette méthode permettrait d'étudier les cellules à l'état intact et donc de conserver les propriétés de liaison et de signalisation des différents ligands. Bref, nous pourrions prouver que les différents ligands induisent des changements conformationnels dans les récepteurs au niveau de la troisième boucle intracellulaire. Ces résultats pourraient être confirmés en observant la structure des récepteurs par rayons-X. L'utilisation de biosenseur dans le criblage à haut débit devient rapidement bien efficace dans la recherche de nouveaux médicaments.

Bien sûr, il faudra par la suite faire des tests d'effets antidépresseurs sur des modèles animaux comme par exemple la mesure d'anhédonie chez le rat qui ont été discutés dans l'introduction. Les propriétés de régulation et de signalisation de différents agonistes étant comparées à celles du RS67333 (dont l'effet antidépresseur est déjà validé) ont été établis, mais il faudra ensuite déterminer s'ils possèdent des effets antidépresseurs dans un modèle animal de la dépression.

Conclusion

Nous avons montré que l'isoforme b du récepteur 5-HT, étant hautement exprimé dans le système limbique, détient une signalisation et une régulation différentes dépendant du ligand activateur. L'ensemble des ligands testés étaient en mesure d'induire une internalisation des récepteurs ou une accumulation du niveau d'AMPc. Dans la mesure de régulation, nous avons observé un effet dans le temps alors qu'en signalisation nous avons observé un effet lié à la concentration. L'ordre d'efficacité des agonistes étaient semblable en régulation autant chez les cellules HEK que dans les neurones alors que l'ordre d'efficacité en signalisation était différent. Ainsi, nous avons montré que la sélectivité fonctionnelle était un important mécanisme à considérer puisque nous avons obtenu différents ordres d'efficacité des agonistes dans un important mécanisme de régulation et de signalisation des RCPGs. Considérant ce changement d'ordre d'efficacité, nous avons conclu que ce changement était dû aux différentes conformations actives des récepteurs, lesquelles devront être prouvées dans le futur.

Il est connu que les antidépresseurs d'aujourd'hui sont loin d'être des agents thérapeutiques idéaux considérant que 20% des patients sont non répondeurs et que 40% répondent partiellement ou ne tolèrent pas les effets secondaires. Un grand désavantage des antidépresseurs actuels est que la latence de l'effet thérapeutique est prolongée (2 à 4 semaines). Une drogue idéale possèderait donc un court temps de latence, une meilleure efficacité et un minimum d'effets secondaires. Dans un modèle animal de la dépression, nous avons observé que l'agoniste RS67333 produisait des effets antidépresseurs importants en trois jours seulement. C'est ainsi que plusieurs études actuelles ciblent les récepteurs sérotoninergiques puisqu'ils peuvent offrir des réponses antidépressives rapides et efficace.

Bibliographie

1. Wong, D.T., K.W. Perry, and F.P. Bymaster, *The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac)*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(9): p. 764-774.
2. Krishnan, K.R., *Revisiting monoamine oxidase inhibitors*. J Clin Psychiatry, 2007. **68 Suppl 8**: p. 35-41.
3. Celada, P., et al., *The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression*. J Psychiatry Neurosci, 2004. **29**(4): p. 252-65.
4. O'Donnell, J.M. and H.T. Zhang, *Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4)*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(3): p. 158-63.
5. Bockaert, J. and J.P. Pin, *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1723-9.
6. Gershengorn, M.C. and R. Osman, *Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models*. Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 2-10.
7. McCudden, C.R., et al., *G-protein signaling: back to the future*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(5): p. 551-77.
8. Pineyro, G., et al., *Autoregulatory properties of dorsal raphe 5-HT neurons: possible role of electrotonic coupling and 5-HT_{1D} receptors in the rat brain*. Synapse, 1996. **22**(1): p. 54-62.
9. Eglen, R.M., et al., *Central 5-HT₄ receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(11): p. 391-8.
10. Hegde, S.S. and R.M. Eglen, *Peripheral 5-HT₄ receptors*. FASEB J, 1996. **10**(12): p. 1398-407.
11. Waeber, C., et al., *[³H]-GR113808 labels 5-HT₄ receptors in the human and guinea-pig brain*. Neuroreport, 1993. **4**(11): p. 1239-42.
12. Vilaro, M.T., R. Cortes, and G. Mengod, *Serotonin 5-HT₄ receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions*. J Comp Neurol, 2005. **484**(4): p. 418-39.
13. Vilaro, M.T., et al., *Localization of 5-HT₄ receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **43**(1-2): p. 356-60.
14. Bockaert, J., et al., *5-HT₄ receptors*. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004. **3**(1): p. 39-51.
15. Nichols, D.E. and C.D. Nichols, *Serotonin receptors*. Chem Rev, 2008. **108**(5): p. 1614-41.
16. Lucas, G., et al., *Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action*. Neuron, 2007. **55**(5): p. 712-25.
17. Cutrer, F.M., et al., *Effects of PNU-109,291, a selective 5-HT_{1D} receptor agonist, on electrically induced dural plasma extravasation and capsaicin-evoked c-fos immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis*. Neuropharmacology, 1999. **38**(7): p. 1043-53.

18. Hamel, E., et al., *Expression of mRNA for the serotonin 5-hydroxytryptamine_{1D} beta receptor subtype in human and bovine cerebral arteries*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(2): p. 242-6.
19. Vilaro, M.T., et al., *Cloning and characterization of a novel human 5-HT₄ receptor variant that lacks the alternatively spliced carboxy terminal exon. RT-PCR distribution in human brain and periphery of multiple 5-HT₄ receptor variants*. Neuropharmacology, 2002. **42**(1): p. 60-73.
20. Bender, E., et al., *Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant*. J Neurochem, 2000. **74**(2): p. 478-89.
21. Barthet, G., et al., *5-hydroxytryptamine 4 receptor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway depends on Src activation but not on G protein or beta-arrestin signaling*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(6): p. 1979-91.
22. Warner-Schmidt, J.L. and R.S. Duman, *Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment*. Hippocampus, 2006. **16**(3): p. 239-49.
23. Blendy, J.A., *The role of CREB in depression and antidepressant treatment*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(12): p. 1144-50.
24. Torres, G.E., Y. Chaput, and R. Andrade, *Cyclic AMP and protein kinase A mediate 5-hydroxytryptamine type 4 receptor regulation of calcium-activated potassium current in adult hippocampal neurons*. Mol Pharmacol, 1995. **47**(1): p. 191-7.
25. Hausdorff, W.P., G. Aguilera, and K.J. Catt, *Inhibitory actions of somatostatin on cyclic AMP and aldosterone production in agonist-stimulated adrenal glomerulosa cells*. Cell Signal, 1989. **1**(4): p. 377-86.
26. Lohse, M.J., et al., *Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors*. J Biol Chem, 1990. **265**(6): p. 3202-11.
27. Ferguson, S.S., et al., *G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins*. Can J Physiol Pharmacol, 1996. **74**(10): p. 1095-110.
28. Hausdorff, W.P., et al., *Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization*. J Biol Chem, 1989. **264**(21): p. 12657-65.
29. Lohse, M.J., et al., *beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1547-50.
30. Lucas, G., et al., *Frontocortical 5-HT₄ receptors exert positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT₄ agonists*. Biol Psychiatry, 2005. **57**(8): p. 918-25.
31. Kenakin, T., *Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals*. Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(7): p. 232-8.
32. Kenakin, T., P. Morgan, and M. Lutz, *On the importance of the "antagonist assumption" to how receptors express themselves*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(1): p. 17-26.
33. Audet, N., et al., *[Functional selectivity of opioid receptors ligands]*. Med Sci (Paris), 2010. **26**(8-9): p. 734-9.

34. Quock, R.M., et al., *The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(3): p. 503-32.
35. Xu, Y., D.W. Piston, and C.H. Johnson, *A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 151-6.
36. Prinz, A., M. Diskar, and F.W. Herberg, *Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies*. Chembiochem, 2006. **7**(7): p. 1007-12.
37. Gandia, J., et al., *Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization*. Bioessays, 2008. **30**(1): p. 82-9.
38. de Rooij, J., et al., *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP*. Nature, 1998. **396**(6710): p. 474-7.
39. Kawasaki, H., et al., *A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2275-9.
40. Kilpinen, S., et al., *Systematic bioinformatic analysis of expression levels of 17,330 human genes across 9,783 samples from 175 types of healthy and pathological tissues*. Genome Biol, 2008. **9**(9): p. R139.
41. Bos, J.L., J. de Rooij, and K.A. Reedquist, *Rap1 signalling: adhering to new models*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(5): p. 369-77.
42. Fasano, C., D. Thibault, and L.E. Trudeau, *Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer*. Curr Protoc Neurosci, 2008. **Chapter 3**: p. Unit 3 21.
43. Mnie-Filali, O., et al., *Serotonin 4 receptor (5-HT₄R) internalization is isoform-specific: effects of 5-HT and RS67333 on isoforms A and B*. Cell Signal, 2010. **22**(3): p. 501-9.
44. Audet, N., et al., *Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins*. J Biol Chem, 2008. **283**(22): p. 15078-88.
45. Scherrer, G., et al., *Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(25): p. 9691-6.
46. Leduc, M., et al., *Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP₄ receptor ligands*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **331**(1): p. 297-307.
47. Hamdan, F.F., et al., *Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET)*. Curr Protoc Neurosci, 2006. **Chapter 5**: p. Unit 5 23.
48. Gales, C., et al., *Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells*. Nat Methods, 2005. **2**(3): p. 177-84.
49. Vargas, G.A. and M. Von Zastrow, *Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37461-9.
50. Ferguson, S.S. and M.G. Caron, *G protein-coupled receptor adaptation mechanisms*. Semin Cell Dev Biol, 1998. **9**(2): p. 119-27.

51. Lefkowitz, R.J., *G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18677-80.
52. Claeysen, S., et al., *Novel brain-specific 5-HT₄ receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(5): p. 910-20.
53. Eglen, R.M., et al., *Pharmacological characterization of two novel and potent 5-HT₄ receptor agonists, RS 67333 and RS 67506, in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol, 1995. **115**(8): p. 1387-92.
54. Lamirault, L., et al., *Combined treatment with galanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, and RS 67333, a partial agonist of 5-HT₄ receptors, enhances place and object recognition in young adult and old rats*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003. **27**(1): p. 185-95.
55. Kobilka, B.K. and X. Deupi, *Conformational complexity of G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(8): p. 397-406.
56. Vaidehi, N. and T. Kenakin, *The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(6): p. 775-81.
57. Hubbell, W.L., et al., *Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking*. Adv Protein Chem, 2003. **63**: p. 243-90.
58. Wess, J., *Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity*. Pharmacol Ther, 1998. **80**(3): p. 231-64.
59. Pineyro, G., *Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling*. Cell Signal, 2009. **21**(2): p. 179-85.
60. Zurn, A., et al., *Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes*. Mol Pharmacol, 2009. **75**(3): p. 534-41.